

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LÚCIA CRISTINA VRIESMANN**

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS REOLÓGICOS DE  
POLISSACARÍDEOS DA POLPA DOS FRUTOS DE *Theobroma grandiflorum*  
(CUPUAÇU)**

**CURITIBA**

**2008**

LÚCIA CRISTINA VRIESMANN

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS REOLÓGICOS DE  
POLISSACARÍDEOS DA POLPA DOS FRUTOS DE *Theobroma grandiflorum*  
(CUPUAÇU)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

CURITIBA

2008

## TERMO DE APROVAÇÃO


LÚCIA CRISTINA VRIESMANN

### EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS REOLÓGICOS DE POLISSACARÍDEOS DA POLPA DOS FRUTOS DE *Theobroma grandiflorum* (CUPUAÇU)

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão composta pelos professores:

  
Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

  
Dr.<sup>a</sup> Eliana Beleski Borba Carneiro

Departamento de Química - UEPG

  
Dr.<sup>a</sup> Maria Rita Sierakowski

Departamento de Química - UFPR

  
Dr.<sup>a</sup> Selma Faria Zawadzki Baggio

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 21 de fevereiro de 2008.

Aos meus pais, Lolke e Bernadete,  
Aos meus irmãos, Leila e Lourenço,  
E ao João Luiz.

Com imenso amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por todas as suas bênçãos, por sempre me acompanhar e por guiar meus passos.

Aos meus pais, Lolke e Bernadete, exemplo de vida e de responsabilidade, pelo seu amor e pela educação que me proporcionaram, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida e pela compreensão da minha ausência, suportando a saudade. Aos meus irmãos, Leila e ao Lourenço, pelo apoio e amor fraternal.

Aos meus avós, Martha e Bernardo, e tios Ana, Lidvina e Pedro, pelo exemplo, por seu carinho, apoio, preocupação e incentivo, sempre.

Ao meu noivo, João Luiz, por ser tão especial em minha vida e estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando emocionalmente, me incentivando e me mostrando o lado positivo das dificuldades, pela paciência e compreensão da minha ausência nos finais de semana e feriados dedicados a experimentos, pelos conselhos, pelo carinho e pelo amor. E à sua família, pela preocupação e interesse.

Aos meus padrinhos da pesquisa, professores Eliana e Paulo, orientadores de iniciação científica, com quem tive o primeiro contato com o estudo dos carboidratos, pela confiança, pelos primeiros ensinamentos, pelo seu entusiasmo e incentivo, e pela dedicação. Em especial, à professora Eliana, que me incentivou ao Mestrado em Bioquímica e me conduziu ao laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR, por acreditar em mim, e pelo interesse e atenção constantes.

Às professoras Carmen, Fany e Joana, por terem me acolhido e confiarem no meu potencial, pela paciência, pelo auxílio e pela oportunidade de aprendizado.

À professora Fany, pela sua constante preocupação e atenção; à professora Joana pela consideração e co-orientação; e em especial à minha orientadora, professora Carmen, por apostar em mim, pela dedicação, disponibilidade e suporte nas dúvidas e tentativas de solucionar os problemas e dificuldades com os experimentos.

Ao Ari Zugman, pela gentil obtenção dos frutos de cupuaçu em Belém, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

A todo o pessoal do laboratório, pelo apoio, cooperação e alegre convivência.

À Heide, pela amizade, pelas dicas e conversas, e pelo incentivo quando apareciam as dificuldades e os problemas.

À Andréa, pela amizade, pelas conversas, pelas dúvidas e questionamentos comuns, que contribuíram para ampliar nosso conhecimento.

À Nana e ao João, pela companhia no laboratório e amizade, e pelo compartilhamento de momentos de descontração e de tensão.

À Andréia, pelas conversas, amizade, empréstimo de livros para meus momentos de lazer e pelas análises de GLC e HPSEC-MALLS.

À Karen, amiga e companheira de congresso, pelas conversas e pela torcida.

À Aline, Ana Paula, Carol, Eneida, Larry, Marília, Meire, Patrícia, Rafael, Rhayla, Ricardo e a todos que estiveram presentes no laboratório durante a realização deste trabalho, pela companhia e por deixarem um pouco de sua essência na lembrança.

Aos colegas do Mestrado, pelo companheirismo, pelas conversas nos corredores, pela companhia em almoços e pela boa convivência nestes dois anos.

Às amigas Lari, Karla, Vivi e Fher, por seu carinho e por me acompanharem mais de perto durante o Mestrado.

À Eloísa, Marli e Márcia, pela amizade, pela troca de informações e de materiais, e pelo compartilhamento de experiências.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, pelo auxílio e empréstimo de materiais.

À Elaine, pela atenção e sugestões nas metilações, e pelas análises de RMN.

À Rosane, pela disponibilidade e pela boa-vontade de cada vez injetar minhas amostras “metiladas” no GLC-MS.

Ao Prof. Dr. Miguel e ao Diogo, pelo auxílio em experimentos de  $^1\text{H}$  RMN.

Ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin pela revisão do Abstract.

Ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do FT-IR e da balança analítica. Em especial ao Ângelo e à professora Jaísa, pela atenção, disponibilidade e auxílio no uso do FT-IR, ao professor Fernando Wypych e ao pessoal do laboratório da professora Ana Mercê, pelo acesso à balança.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela assistência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade, e à Marilza, sempre prestativa.

Ao CNPq e PRONEX pelo apoio financeiro.

A todos que torceram por mim ou que contribuíram para a realização deste trabalho, e que de alguma forma eu não tenha citado.

Muito obrigada!!!

**Cada conquista impulsiona outras buscas  
e abre novos horizontes.**

## RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum, Família Sterculiaceae) é um fruto nativo da região amazônica. Sua polpa apresenta um forte aroma e um agradável sabor ácido, sendo empregada em doces, sorvetes e geléias caseiras. Neste trabalho, a polpa dos frutos de cupuaçu foi triturada, tratada com metanol-água e deslipidificada com tolueno-etanol. O resíduo obtido (4% em relação à polpa fresca) foi submetido a extrações sequenciais com água, soluções aquosas de ácido cítrico e de hidróxido de sódio. As extrações aquosas solubilizaram principalmente pectinas, enquanto que as extrações ácidas, em sua maioria, solubilizaram amido. Em geral, as frações alcalinas apresentaram um elevado teor de Xyl, Man, Gal e Glc, indicando a presença de hemiceluloses. As frações polissacarídicas obtidas apresentaram rendimento entre 0,3 e 15% em relação ao material de partida. As principais frações foram extraídas com água a 25°C (fração W-1, 7% de rendimento), com ácido cítrico a 0,1% a 100°C (fração 0.1CA-2, 15% de rendimento) e com ácido cítrico a 0,5% a 100°C (fração 0.5CA-2, 8% de rendimento). As duas últimas frações foram constituídas majoritariamente por amido, enquanto que a fração W-1 é uma fração péctica. Análises químicas e espectroscópicas mostraram que a fração W-1 é composta majoritariamente por uma homogalacturonana altamente esterificada (DE 53,1%; DA 1,7%) com algumas inserções de ramnogalacturonanas, com cadeias laterais contendo galactose e arabinose, além de conter uma pequena proporção de amido. O amido, presente como contaminante, foi removido da fração W-1 por tratamento com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase resultando na fração PW-1, livre de amido. Ambas as frações pécticas, W-1 e PW-1, foram analisadas reologicamente. Os géis de pectina (1-3%, p/p) foram preparados em pH ácido (3,0) na presença de elevada concentração de sacarose (55-65%). De maneira geral, tanto o aumento da concentração de pectina como o aumento da concentração de sacarose influenciaram positivamente os géis, sendo que os géis mais fortes foram obtidos para a fração W-1, tanto em termos de comportamento viscoelástico quanto em relação à termoestabilidade. A fração 0.1CA-2, rica em amido, foi analisada através de espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  RMN, apresentando os sinais característicos de moléculas de amilose. Esta fração também foi analisada quanto às suas propriedades reológicas. Para as análises reológicas, os géis foram preparados variando a concentração da fração (4-7%, p/p). Quanto maior a concentração de amostra, maiores foram a viscosidade e a força dos géis, embora os géis de pectinas tenham apresentado propriedades reológicas superiores aos géis de amido. Os resultados obtidos mostraram a presença de pectinas e amido com altas capacidades geleificantes na polpa dos frutos de cupuaçu.

**Palavras-chave:** *Theobroma grandiflorum*. Cupuaçu. Polissacarídeos. Pectinas. Amido. Reologia.



## ABSTRACT

The cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum, Sterculiaceae) is a native Amazonian fruit. Its pulp has a pleasant acidic taste and a strong fragrance and is used in candies, ice cream, domestic jellies, and jams. We now milled the fruit pulp, treated with methanol-water and defatted with toluene-ethanol. The resulting residue (4% related to the fresh pulp) was submitted to successive extractions with water, citric acid and NaOH. Aqueous extractions solubilized principally pectins, while acid extractions mainly solubilized starch. In general, alkaline polysaccharide fractions had a high content of Xyl, Man, Gal and Glc, indicating the presence of hemicellulose. The polysaccharide fractions had yields from 0.3% to 15% depending on the starting material. The main fractions were those extracted with water at 25°C (W-1 fraction, 7% yield), 0.1% citric acid at 100°C (0.1CA-2 fraction, 15% yield) and 0.5% citric acid at 100°C (0.5CA-2 fraction, 8% yield). The last two fractions were composed mainly of starch, while W-1 was a pectic fraction. Chemical and spectroscopic analysis showed that W-1 is composed mainly by a highly esterified homogalacturonan (DE 53.1%; DA 1.7%) with some insertions of rhamnogalacturonan, with side chains containing galactose and arabinose, besides starch in a low proportion. Starch, present as contaminant, was removed from the W-1 fraction by treatment with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase, yielding starch-free PW-1 fraction. Both pectic fractions, W-1 and PW-1, were submitted to rheological experiments. Pectin gels (1-3%, w/w) were prepared at pH 3.0 in the presence of a high sucrose concentration (55-65%). In general, gels were influenced positively by increases in pectin and sucrose content, the stronger gels being those obtained for fraction W-1, in terms of viscoelastic behavior as well as in relation to thermal stability. Starch-rich 0.1CA-2 fraction was analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR, having characteristic signals of amylose. It was also analyzed for its rheologic properties. For rheological analysis, gels were prepared varying the fraction concentration (4-7%, w/w). Depending on a high concentration of the fraction, the gel viscosity and strength were greater, although pectin gels had better rheologic properties than starch gels. The obtained results showed the presence of pectins and starch with high geleificant capabilities in the pulp of the cupuassu fruit.

**Keywords:** *Theobroma grandiflorum*. Cupuassu. Polysaccharides. Pectins. Starch. Rheology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática das estruturas de pectinas .....	23
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de ligação cruzada de moléculas de pectinas: (A) LM na presença de cálcio; (B) HM em meio ácido .....	27
<b>Figura 3</b> - Tipos comuns de comportamento de fluxo.....	34
<b>Figura 4</b> - Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (A) gel forte; (B) solução concentrada; (C) solução diluída.....	38
<b>Figura 5</b> - Árvore de <i>Theobroma grandiflorum</i> , e seu fruto, o cupuaçu .....	40
<b>Figura 6</b> - Fruto de cupuaçu aberto ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ).....	41
<b>Figura 7</b> - Procedimento de extração dos polissacarídeos da polpa do cupuaçu.....	45
<b>Figura 8</b> - Curva de calibração para determinação do DE por FT-IR .....	61
<b>Figura 9</b> - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração W-1 .....	65
<b>Figura 10</b> - Espectro de FT-IR da fração W-1.....	67
<b>Figura 11</b> - Região de campo baixo do espectro de $^1\text{H}$ RMN da fração W-1.....	68
<b>Figura 12</b> - Região de campo baixo do espectro de $^1\text{H}$ RMN do padrão de pectina SIGMA com DE 89%.....	69
<b>Figura 13</b> - Espectro de $^1\text{H}$ RMN utilizado para uma das determinações do grau de acetilação da fração W-1 .....	70

<b>Figura 14</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN da fração W-1 em $\text{D}_2\text{O}$ , obtido a $70^\circ\text{C}$ .....	71
<b>Figura 15</b> - Varreduras de frequência a $25^\circ\text{C}$ da fração W-1 a 2% com concentrações de sacarose de 55, 60 e 65% nas deformações de 0,27; 0,7 e 0,12%, respectivamente .....	74
<b>Figura 16</b> - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração W-1 a 2% contendo 55-65% de sacarose na frequência de 1Hz .....	76
<b>Figura 17</b> - Rampa de temperatura do gel da fração W-1 a 2% com 60% de sacarose na frequência de 1Hz .....	77
<b>Figura 18</b> - Varreduras de frequência a $25^\circ\text{C}$ da fração W-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose nas deformações de 0,4; 0,12 e 0,04%, respectivamente .....	78
<b>Figura 19</b> - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração W-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz .....	80
<b>Figura 20</b> - Rampa de temperatura do gel da fração W-1 a 1% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz .....	81
<b>Figura 21</b> - Perfis de eluição por HPSEC-MALLS das frações W-1 nativa (A) e PW-1 (após tratamento com amilase e amiloglicosidase) (B) .....	84
<b>Figura 22</b> - Espectro de FT-IR da fração PW-1 .....	84
<b>Figura 23</b> - Varreduras de frequência a $25^\circ\text{C}$ da fração PW-1 a 2% com concentrações de sacarose de 55, 60 e 65% nas deformações de 4,0; 0,4 e 0,3%, respectivamente .....	85
<b>Figura 24</b> - Varreduras de frequência a $25^\circ\text{C}$ das frações W-1 e PW-1 a 2% com 60% de sacarose nas deformações de 0,7 e 0,4%, respectivamente .....	86

<b>Figura 25</b> - Varreduras de frequência a 25°C da fração PW-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose nas deformações de 2,0; 0,3 e 0,22%, respectivamente .....	88
<b>Figura 26</b> - Varreduras de frequência a 25°C das frações W-1 e PW-1 a 3% com 65% de sacarose nas deformações de 0,04 e 0,22%, respectivamente .....	89
<b>Figura 27</b> - Rampa de temperatura do gel da fração PW-1 a 1% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz .....	90
<b>Figura 28</b> - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração 0.1CA-2 .....	92
<b>Figura 29</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN em $\text{D}_2\text{O}$ a 70°C, (A) fração 0.1CA-2; (B) dept-135 da fração 0.1CA-2 .....	93
<b>Figura 30</b> - Varreduras de frequência a 25°C da fração 0.1CA-2 a 4, 5, 6 e 7% nas tensões de 1,5; 4,0; 1,0 e 3,0 Pa, respectivamente .....	94
<b>Figura 31</b> - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração 0.1CA-2 na frequência de 1Hz .....	96
<b>Figura 32</b> - Rampa de temperatura do gel da fração 0.1 CA-2 a 5% na frequência de 1Hz .....	97
<b>Figura 33</b> - Influência da taxa de cisalhamento na viscosidade absoluta dos géis da fração 0.1CA-2 a 25°C .....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Rendimento, teor de carboidratos e de proteínas das frações polissacarídicas obtidas a partir da polpa do cupuaçu ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ) .....	57
<b>Tabela 2</b> - Composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos da polpa do cupuaçu ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ) .....	59
<b>Tabela 3</b> - Grau de esterificação (DE), determinado por FT-IR, das pectinas obtidas da polpa do cupuaçu .....	62
<b>Tabela 4</b> - Comparação entre a composição monossacarídica da fração W-1 nativa e carboxi-reduzida (RW-1) .....	72
<b>Tabela 5</b> - Composição monossacarídica das frações PW-1 e W-1 obtidas da polpa do cupuaçu.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 0.1CA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 0,1% a 50°C (60 min)
- 0.1CA-2 - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 0,1% a 100°C (60 min)
- 0.5CA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 0,5% a 50°C (60 min)
- 0.5CA-2 - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 0,5% a 100°C (60 min)
- 1CA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 1% a 50°C (60 min)
- 1CA-2 - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 1% a 100°C (60 min)
- 2.5CA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 2,5% a 50°C (60 min)
- 2.5CA-2 - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 2,5% a 100°C (60 min)
- 2M-HemiA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> a 25°C após neutralização do extrato
- 2M-HemiB - Fração da polpa do cupuaçu remanescente no extrato da extração com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> a 25°C após neutralização e obtida por precipitação com etanol
- 4M-HemiA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com NaOH 4 mol.L<sup>-1</sup> a 25°C após neutralização do extrato
- 4M-HemiB - Fração da polpa do cupuaçu remanescente no extrato da extração com NaOH 4 mol.L<sup>-1</sup> a 25°C após neutralização e obtida por precipitação com etanol
- 5CA - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 5% a 50°C (60 min)
- 5CA-2 - Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração com ácido cítrico a 5% a 100°C (60 min)
- CH<sub>3</sub>I - Iodeto de metila

$^{13}\text{C}$ RMN	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
DA	- Grau de acetilação
DE	- Grau de esterificação
dept	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho incorporando transformador Fourier
G'	- Módulo de armazenamento ou módulo de cisalhamento elástico
G''	- Módulo de perda ou módulo de cisalhamento viscoso
G*	- Módulo de cisalhamento complexo
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GLC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HG	- Homogalacturonana
HM	- Pectinas com grau de esterificação superior a 50%
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta performance
$^1\text{H}$ RMN	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
HW	- Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração aquosa a 60°C (180 min)
LM	- Pectinas com grau de esterificação inferior a 50%
MALLS	- Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos
Me <sub>2</sub> SO	- Dimetil-sulfóxido
$\eta$	- Viscosidade
$\eta^*$	- Viscosidade dinâmica complexa
NaBD <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	- Azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	- Pentóxido de fósforo
PW-1	- Fração W-1 tratada com $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase
RG	- Ramnogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana do tipo II
RI	- Índice de refração
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RW-1	- Fração W-1 carboxi-reduzida

$\tau$	- Tensão de cisalhamento
TFA	- Ácido trifluoracético
W-1	- Fração obtida da polpa do cupuaçu por extração aquosa a 25°C (90 min)
W-2	- Fração obtida da polpa do cupuaçu por uma segunda extração aquosa a 25°C (90 min)
$\dot{\gamma}$	- Taxa de cisalhamento



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	19
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL	19
2.1.1 Celulose e hemiceluloses	20
2.1.2 Pectinas	21
2.1.2.1 Propriedades e aplicações das pectinas	24
2.1.2.2 Geleificação de pectinas	25
2.2 AMIDO	29
2.3 POLISSACARÍDEOS E REOLOGIA	32
2.3.1 Reologia, viscosidade e comportamento de fluidos	32
2.3.2 Viscoelasticidade e soluções poliméricas	36
2.4 CUPUAÇU	39
<b>3 OBJETIVOS</b>	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	43
4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> )	43
4.2 ISOLAMENTO DA POLPA DO CUPUAÇU, INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E DESLIPIDIFICAÇÃO	43
4.3 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO CUPUAÇU	43
4.4 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS	45
4.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	46
4.5.1 Hidrólises ácidas totais	46
4.5.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados	47
4.6 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE	48
4.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS	48
4.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACETILAÇÃO POR $^1\text{H}$ RMN	50
4.9 CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO W-1	50
4.10 METILAÇÃO	51
4.11 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO W-1	52
4.12 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	52

4.13 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES REOLÓGICAS.....	53
4.14 ANÁLISES REOLÓGICAS .....	54
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO CUPUAÇU.....	55
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO W-1 .....	63
5.2.1 Composição química.....	63
5.2.2 Análise por HPSEC-MALLS .....	65
5.2.3 Determinação do grau de esterificação e de acetilação.....	66
5.2.4 Análise por espectroscopia de <sup>13</sup> C-RMN.....	71
5.2.5 Análises de carboxi-redução e metilação .....	72
5.2.6 Análises reológicas .....	73
5.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO W-1, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES REOLÓGICAS DA PECTINA PURIFICADA.....	82
5.3.1 Purificação e caracterização .....	82
5.3.2 Análises reológicas da fração PW-1.....	85
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO 0.1CA-2 .....	91
5.4.1 Composição química.....	91
5.4.2 Análise por HPSEC-MALLS .....	91
5.4.4 Análises reológicas .....	93
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos extraídos de plantas abrangem uma considerável fonte de polímeros para diversas aplicações industriais. O amido domina o mercado mundial na indústria alimentícia, mas outros polissacarídeos também vêm sendo empregados em quantidades crescentes como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, suspensores e geleificantes.

Por exemplo, as pectinas, presentes em quantidades significativas em muitos frutos, são amplamente empregadas em doces, bebidas e molhos, onde atuam principalmente como agente geleificante, estabilizante e espessante.

Todos os frutos e verduras contêm carboidratos. Em frutos frescos, parte deles está presente na parede celular como celulose, hemiceluloses e pectinas, cujas proporções variam de acordo com a espécie (GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996; MEYER, 1960).

Após ampla revisão bibliográfica não foram encontrados dados na literatura sobre a caracterização dos carboidratos dos frutos de *Theobroma grandiflorum*, conhecido popularmente como cupuaçu. Neste trabalho isolou-se e caracterizou-se polissacarídeos da polpa do cupuaçu.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica, cuja forma, composição e propriedades são constantemente alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula. Nas células vivas, a parede celular influencia a taxa e a direção do crescimento celular, exercendo uma profunda influência no desenvolvimento e morfologia vegetal. Assim, determina a forma da célula, a textura do tecido e a forma final do órgão vegetal (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As células de plantas em crescimento, de tecidos vegetais suculentos e células parenquimáticas de folhas e frutos apresentam uma parede primária, capaz de se expandir. Os polissacarídeos somam cerca de 90% dos polímeros estruturais das paredes celulares primárias. Quando uma célula cresce, as ligações entre os polissacarídeos da parede são rompidas, a célula se expande e novos polissacarídeos são sintetizados e inseridos entre os já existentes. Este processo envolve o rompimento e a formação de numerosas ligações covalentes e não covalentes. Desse modo as células podem aumentar muitas vezes seu comprimento, sem enfraquecimento da parede (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; CARPITA; McCANN, 2000; FRESHOUR *et al.*, 1996; PÉREZ, MAZEAU; du PENHOAT, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A região que une as paredes primárias de células vizinhas é a lamela média, uma camada rica em pectinas. Muitas células apresentam uma parede secundária, que se desenvolve a partir da primária e se localiza internamente a esta, sendo caracterizada pela presença de lignina, que interrompe o crescimento celular, resultando na diferenciação terminal da célula por conferir resistência à compressão e rigidez à parede (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A parede celular é uma estrutura altamente organizada composta de diferentes polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas. Os principais polissacarídeos presentes em paredes celulares são celulose, hemiceluloses e pectinas (CARPITA; McCANN, 2000).

### 2.1.1 Celulose e hemiceluloses

A celulose é o mais abundante polissacarídeo da parede celular vegetal, presente tanto nas paredes primárias quanto nas secundárias. Ela constitui cerca de 15 a 30% da matéria seca de parede celular primária e ocupa cerca de 15% de seu volume (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; VARNER; LIN, 1989). É o composto que fornece resistência (força) aos tecidos vegetais, sendo formado por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1→4) (MEYER, 1960). A celulose está presente como microfibrilas localizadas numa matriz entremeada por moléculas não-celulósicas, incluindo hemiceluloses, pectinas e glicoproteínas (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As hemiceluloses são polissacarídeos da matriz da parede celular, distintos de celulose e pectinas, solúveis em álcali e encontrados em paredes celulares primárias e secundárias. Constituem cerca de 20% do peso seco da parede celular e representam um grupo heterogêneo de polissacarídeos em relação aos tipos de monossacarídeos e à natureza das ligações glicosídicas (DEY; HARBORNE, 1997; WILKIE, 1979; WONG; SADDLER, 1993). Em geral se associam à celulose e à lignina na parede celular e são constituídas de longas cadeias, muitas vezes com numerosas ramificações curtas, constituídas de uma ou várias unidades monossacarídicas, que normalmente são diferentes daquelas que constituem a cadeia principal (WHISTLER, 1993).

Os principais monossacarídeos que compõem as hemiceluloses de plantas terrestres são D-xilose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-manose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; PULS; SCHUSEIL, 1993; TIMELL, 1964). As principais hemiceluloses são as xiloglucanas e glucuronoarabinoxilanas - que são constituintes de paredes celulares primárias - além de mananas, glucomananas e galactoglucomananas (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; TIMELL, 1964).

### 2.1.2 Pectinas

As pectinas somam cerca de um terço da matéria seca da parede celular de dicotiledôneas e muitas monocotiledôneas, onde exercem diferentes funções. A maior parte destes polissacarídeos é encontrada na lamela média das paredes celulares vegetais, onde são importantes para a adesão célula-célula. Já as pectinas presentes na parede celular primária contribuem para a retenção de água e formação de géis, que influenciam as propriedades mecânicas da parede celular (CARPITA; McCANN, 2000; JARVIS, 1988; MacDOUGALL *et al.*, 1996; MELFORD; DEY, 1986; Van BUREN, 1991).

As cadeias de pectina podem estabelecer ligações cruzadas com íons cálcio nas chamadas zonas de junção. A extensão dessas zonas e o padrão de substituição na cadeia principal permitem a formação de um gel que fornece um fino controle da porosidade da parede, regulando a difusão de íons, nutrientes e enzimas da parede celular, modulando o pH e o balanço iônico. Por limitar a porosidade da parede, as pectinas podem afetar o crescimento celular, regulando o acesso de enzimas aos seus substratos. Além disso, as pectinas servem como moléculas de reconhecimento que sinalizam a presença de organismos simbióticos, patógenos e insetos nas plantas (CARPITA; McCANN, 2000; McCANN *et al.*, 1995).

A textura de frutos e verduras durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento é fortemente influenciada pela quantidade e natureza das pectinas presentes. Modificações importantes das propriedades de frutos, verduras e outros produtos vegetais durante a estocagem e processamento estão relacionadas a alterações dos componentes pécticos (VORAGEN *et al.*, 1995).

Como outros polissacarídeos vegetais, as pectinas são polidispersas, exibindo uma significativa heterogeneidade com respeito à estrutura química e à massa molecular (PÉREZ, MAZEAU; du PENHOAT, 2000).

Quimicamente, as pectinas compreendem uma família de polissacarídeos constituída por homogalacturonanas (HG) e ramnogalacturonanas (RG), ilustradas na Figura 1. Homogalacturonanas constituem a região lisa ou *smooth region* das cadeias de pectinas e são homopolímeros de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→4) nas quais muitos dos grupos ácidos estão metil-esterificados. Elas também podem, dependendo do tipo de planta,

estar parcialmente *O*-acetiladas em C-3 ou C-2 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001).

Ramnogalacturonanas constituem a região ramificada ou *hairy region* das pectinas e são divididas em dois tipos: ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II). RG-I consiste de uma cadeia principal de unidades alternantes de ácido D-galacturônico ligadas  $\alpha$ -(1→4) e ramnose ligadas  $\alpha$ -(1→2), à qual se ligam cadeias laterais neutras tais como arabinanas e arabinogalactanas (De VRIES, 1988; SCHOLS; VORAGEN, 2002). Outros açúcares que podem estar ligados nas cadeias laterais são: D-xilose, D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico (VORAGEN *et al.*, 1995).

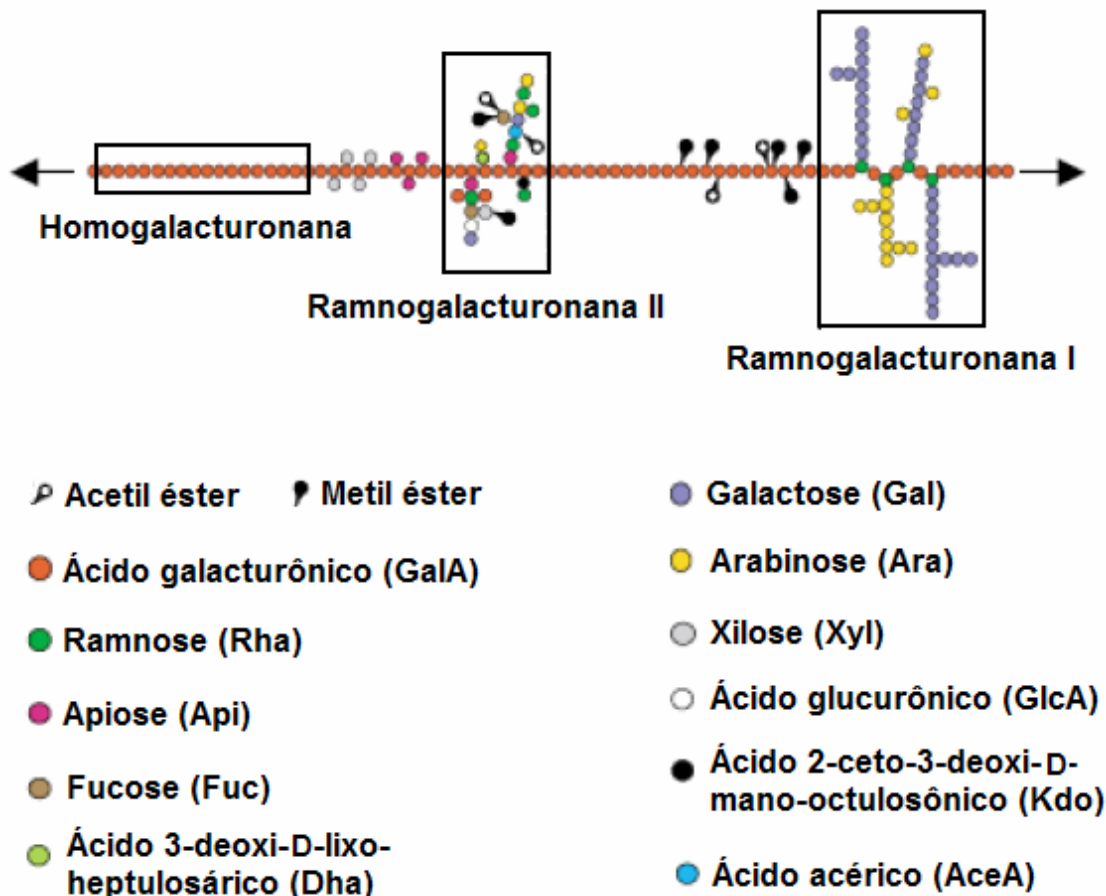
As arabinanas são polissacarídeos que apresentam uma cadeia principal de unidades furanosídicas de L-arabinose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1→5), com ramificações ligadas a várias unidades da cadeia principal na posição *O*-2 e/ou *O*-3 (PÉREZ, MAZEAU; du PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995).

As arabinogalactanas ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. As arabinogalactanas do tipo I têm uma cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose ligadas  $\beta$ -(1→4) com 20-40% de unidades furanosídicas de L-arabinose ligadas  $\alpha$ -(1→5) presentes em cadeias laterais curtas conectadas na posição *O*-3 das unidades de galactose (PÉREZ, MAZEAU; du PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995).

Já as arabinogalactanas do tipo II são polissacarídeos altamente ramificados, com cadeias de unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose unidas por ligações (1→3) e (1→6). As ligações (1→3) predominam nas cadeias internas, enquanto que as ligações (1→6) ocorrem principalmente nas cadeias externas, que são geralmente terminadas por unidades L-arabinofuranosil e em algum grau por unidades L-arabinopiranosil (VORAGEN *et al.*, 1995).

RG-II é o menor e mais complexo polissacarídeo péctico das paredes celulares vegetais (PELLERIN *et al.*, 1996). Contém uma alta proporção de unidades de ramnose ligadas (1→3) e (1→2,3,4) e como unidades terminais (VORAGEN *et al.*, 1995). Vários autores descrevem este polissacarídeo apresentando uma cadeia principal de 8-10 unidades de ácido galacturônico com quatro cadeias laterais complexas consistindo de 12 monossacarídeos diferentes e 20 ligações distintas (MELTON *et al.*, 1986; PELLERIN *et al.*, 1996; RODRIGUEZ-CARVAJAL *et al.*,

2003; VIDAL *et al.*, 2000). É característica de RG-II a presença de açúcares raros, tais como apiose (DARVILL; McNEILL; ALBERSHEIM, 1978), ácido acérico (ou 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose) (SPELLMAN *et al.*, 1983), 2-O-metil-fucose (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL; McNEILL; ALBERSHEIM, 1978), 2-O-metil-xilose (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL; McNEILL; ALBERSHEIM, 1978), Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) (STEVENSON; DARVILL; ALBERSHEIM, 1988) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico) (YORK *et al.*, 1985). As unidades de apiose da cadeia lateral de dois monômeros de RG-II são esterificadas com ácido bórico, formando dímeros de RG-II (ISHII *et al.*, 1999; KOBAYASHI; MATOH; AZUMA, 1996).



**Figura 1** - Representação esquemática das estruturas de pectinas  
ADAPTADO DE: WILLATS; KNOX e MIKKELSEN (2006).

A presença de xilogalacturonanas ou galacturonanas ricas em xilose foi identificada em grãos de soja, ervilha, melancia, casca de limão e maçã. As



unidades de xilose estão presentes como cadeias laterais de uma única unidade ligada à posição O-3 das unidades piranosídicas de ácido galacturônico (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; VORAGEN *et al.*, 1995).

Todas as moléculas de pectina contêm segmentos lineares de ácido galacturônico cujos grupos carboxílicos podem estar esterificados com metanol (ROLIN, 1993). A proporção de grupos carboxílicos metil-esterificados nas pectinas é expressa como grau de esterificação (DE). Dependendo do grau de esterificação, as pectinas são divididas em dois grupos: pectinas com alto teor de esterificação (HM), com um DE superior a 50%, e pectinas com baixo teor de esterificação (LM), com um DE inferior a 50% (VORAGEN *et al.*, 1995).

#### 2.1.2.1 Propriedades e aplicações das pectinas

Pectinas formam gel sob certas circunstâncias e esta propriedade as torna um importante aditivo na indústria farmacêutica e de alimentos (PÉREZ, MAZEAU; du PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995). Devido às suas propriedades estabilizantes e espessantes, as pectinas são utilizadas como importantes aditivos em geléias, maionese, cremes para saladas, molhos, sucos concentrados, bebidas e sorvetes (VORAGEN *et al.*, 1995).

Pela estabilidade em baixos valores de pH, as pectinas apresentam aplicações em alimentos ácidos, estabilizando bebidas lácteas e suas combinações com sucos de frutas (MAY, 1990; ROLIN, 1993). São amplamente empregadas como texturizador, estabilizante e emulsificante numa grande variedade de produtos. Seu uso como substituto de açúcar e gordura em alimentos dietéticos está crescendo, com a maior demanda destes produtos. As pectinas atuam como fibras dietéticas, diminuem o nível do colesterol sanguíneo e afetam a absorção de glucose, reduzindo a resposta do organismo à curva glicêmica (VORAGEN *et al.*, 1995).

As pectinas comerciais são normalmente provenientes das cascas de frutas cítricas ou do bagaço da maçã, subprodutos da fabricação de sucos (ROLIN, 1993; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A composição da pectina varia com a fonte da qual esta é isolada, bem como com as condições usadas durante seu isolamento

e purificação (ROLIN; NIELSEN; GLAHN, 1998). No bagaço de maçã, dependendo do tipo de extração, pode-se obter de 13,3 a 20,9% de substâncias pécicas (CANTERI-SCHEMIN, 2005), e para cítricos, o rendimento varia de 20 a 26% (KRAVTCHENKO; VORAGEN; PILNIK, 1992).

Outras fontes de pectinas que vêm sendo estudadas incluem as polpas de beterraba e de batata, as cascas de soja, os resíduos de sementes de girassol e de frutas como cacau, cajá, maracujá e manga (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; IGLESIAS; LOZANO, 2004; KALAPATHY; PROCTOR, 2001; KOUBALA *et al.*, 2008; MOLLEA; CHIAMPO; CONTI, 2007; OOSTERVELD *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2007; TURQUOIS *et al.*, 1999; YAPO *et al.*, 2007; YAPO; KOFFI, 2006).

#### 2.1.2.2 Geleificação de pectinas

A geleificação de pectinas ocorre somente sob certas condições. Fatores determinantes da ocorrência da geleificação e que influenciam as características do gel incluem: temperatura, concentração de pectina, pH, concentração de solutos (açúcares) e concentração de íons, como o  $\text{Ca}^{+2}$  (ROLIN, 1993).

Os limites estabelecidos por estes fatores e os modos nos quais eles influenciam a geleificação são dependentes das propriedades moleculares das pectinas, como massa molecular, grau de esterificação e de amidação, presença de ésteres de acetila em O-2 e O-3 na cadeia de galacturonana, distribuição de ramnose causando torções na cadeia de pectina e distribuição (randômica ou em blocos) dos grupos ésteres ao longo da molécula (AXELOS; THIBAUT, 1991; ROLIN, 1993). Desta maneira, pectinas de fontes distintas apresentam variações nestes fatores, e suas capacidades geleificantes serão diferenciadas (SATO *et al.*, 2004).

Os mecanismos de geleificação são diferentes para pectinas de alto teor de esterificação (HM) e de baixo teor de esterificação (LM) (OAKENFULL, 1991; ROLIN, 1993; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

A geleificação de soluções aquosas de pectinas HM é freqüentemente observada em pH ácido (inferior a 3,5), na presença de grandes quantidades de açúcares ou co-solutos semelhantes (tipicamente 60-65% de sacarose); sendo este

o procedimento usado na produção convencional de geléias (BULONE *et al.*, 2002; CHRISTENSEN, 1986; MAY, 1990; OAKENFULL; SCOTT, 1984; REES, 1969).

A alta concentração de co-solutos cria condições de baixa atividade da água, onde as interações cadeia-cadeia predominam em relação às interações cadeia-solvente, enquanto que o pH ácido reduz as cargas negativas dos grupos carboxílicos, diminuindo assim as repulsões eletrostáticas entre as cadeias (ROLIN, 1993; VORAGEN *et al.*, 1995).

Com a redução das repulsões e da disponibilidade de água para solvatação das pectinas HM, há aproximação das cadeias e a formação de zonas de junção, que são estabilizadas por interações hidrofóbicas entre os grupos éster metílicos e por pontes de hidrogênio entre grupos carboxílicos não-dissociados e álcoois secundários, como demonstrado na Figura 2(B) (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; VORAGEN *et al.*, 1995; WALKINSHAW; ARNOTT, 1981).

Sob condições semelhantes, pectinas HM com maior massa molecular formam géis mais fortes. Grupos acetílicos em proporções elevadas impedem a geleificação das pectinas e o grau de esterificação, dentro do grupo das pectinas HM, determina seu nível de geleificação em termos de temperatura e pH, desde pectinas ultra-rápidas até lentas (VORAGEN *et al.*, 1995).

Tsoga, Richardson e Morris (2004) estudaram o comportamento de géis de pectinas comerciais com DE 70% (a 1%) empregando como co-solutos sólidos xilitol, sorbitol, glucose, frutose ou sacarose em concentrações de 50, 55, 60 e 65%, variando a temperatura de 5-90°C e em pH fixo em 3,0. Os géis mais fortes foram obtidos com a sacarose.

Usando uma pectina comercial com DE 70,3% na concentração de 0,5% e 65% de sacarose e pH variando entre 3,0 e 4,7, Evageliou, Richardson e Morris (2000) mostraram que a força dos géis aumentou com a redução do pH.

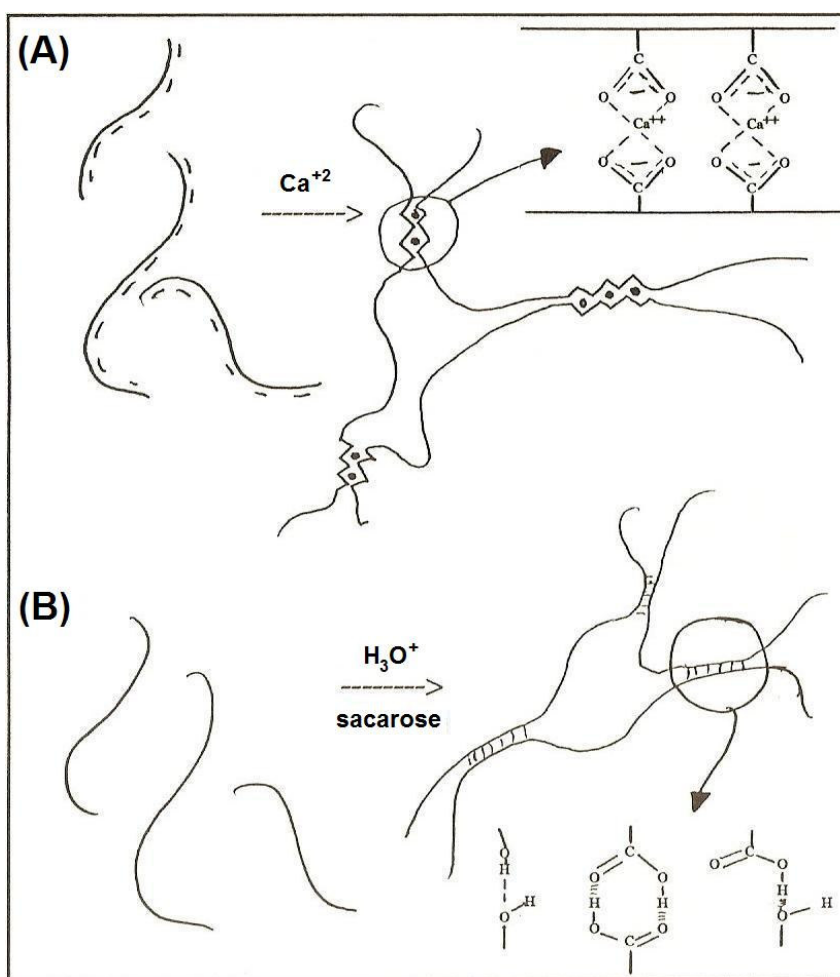
Sharma, Liptay e Le Maguer (1998) verificaram que quando as pectinas HM obtidas da polpa de tomates foram usadas para geleificação na presença de várias concentrações de sacarose (50-70%) em diferentes pH (2,0 a 5,0) houve formação de géis com 60% de sacarose em pH inferior a 3,0. A força do gel aumentou com a redução do pH e com o aumento da concentração de pectina de 1 para 2%.

El-Nawawi e Heikel (1997) utilizaram sacarose nas concentrações de 55, 65 e 75% para a geleificação de pectinas HM de cítricos a 0,4%, variando o pH de 2,2 a 3,4. A tendência à formação dos géis pareceu ser afetada tanto pelo pH quanto pela

concentração de sacarose. Os melhores géis foram obtidos com 75% de sacarose em pH 3,2 e 65% em pH 3,0.

Segundo Rolin e de Vries (1990) o pH de 3,1 seria o ideal para a geleificação de pectinas HM. Os autores demonstraram que valores de pH muito baixos são críticos para a geleificação deste tipo de pectina e que não ocorre formação de géis em pH superior a 3,5.

No caso de pectinas LM, com grau de esterificação abaixo de 50%, a geleificação acontece na presença de cátions divalentes, como o cálcio, que age como uma ponte entre pares de grupos carboxílicos de diferentes cadeias de pectinas numa ampla faixa de pH, formando zonas de junção, como demonstrado na Figura 2(A) (MALOVIKOWÁ; RINAUDO; MILAS, 1994; MORRIS, 1986; REES, 1969; THIBAUT; RINAUDO, 1986).



**Figura 2** - Mecanismos de ligação cruzada de moléculas de pectinas: (A) LM na presença de cálcio; (B) HM em meio ácido  
ADAPTADO DE: RINAUDO (1996).

Este tipo de formação de zonas de junção pode ser descrito pelo modelo *egg box*, onde as cadeias de pectato são hélices duplas e nas zonas de junção, com seu arranjo antiparalelo, estas cadeias formam espaços ou fendas de ligação, as quais aprisionam íons cálcio, que ligam as cadeias entre si. A geleificação aparentemente envolve dois estágios, sendo o primeiro a formação de dímeros (caixa de ovos) e o segundo a condensação dos dímeros em agregados (muitas caixas de ovos são posicionadas juntas) (ROLIN, 1993).

Pela natureza eletrostática das ligações, os géis de pectinas LM são muito sensíveis a parâmetros intrínsecos que podem modificar o ambiente dos grupos carboxílicos, como a natureza, distribuição e quantidade de substituintes ao longo da cadeia galacturônica. Assim, a capacidade de formação de gel aumenta com o decréscimo do DE, e pectinas LM com grupos carboxílicos livres distribuídos em blocos são muito sensíveis a baixos níveis de cálcio. A acetilação reduz a afinidade das pectinas para com o cálcio e a amidação (presença de grupo amida em C-6) melhora a capacidade das pectinas LM de formar géis (VORAGEN *et al.*, 1995).

O processo de geleificação de pectinas LM também depende de fatores externos, como temperatura, pH, força iônica e quantidade de cálcio adicionada. Se a sacarose estiver presente, seu efeito combinado com o pH permite geleificação a menores níveis de cálcio por promover interações cadeia-cadeia (VORAGEN *et al.*, 1995).

A influência da concentração de cálcio e do pH em géis de pectinas LM amidadas e não-amidadas foi investigada por Lootens e colaboradores (2003). Os autores verificaram que, para este último tipo de pectina, em pH abaixo de 3,0 houve um enfraquecimento do gel formado por cálcio, enquanto que para pectinas amidadas, o gel foi fortalecido.

Cardoso, Coimbra e Lopes da Silva (2003), semelhantemente a Fu e Rao (2001), observaram que tanto uma elevação na concentração de pectina quanto na concentração de sacarose favorecem a formação de géis de pectina LM.

Iglesias e Lozano (2004) reportaram a importância da adição simultânea de sacarose e cálcio em géis de pectinas LM. Grosso e Rao (1998) observaram que o aumento da concentração de cálcio com concentração fixa de sólidos solúveis, melhorava a qualidade do gel de forma mais significativa do que a variação da concentração de sólidos solúveis com concentração fixa de cálcio.

Na maioria dos casos, um gel de pectina é preparado sob aquecimento e então solidificado por resfriamento. Quando resfriado abaixo da temperatura de geleificação, sistemas contendo pectinas LM geleificarão quase que instantaneamente, enquanto que sistemas com pectinas HM geleificarão após certo tempo. Uma vez formado, o gel de pectina HM não pode ser desfeito, mas um gel de pectina LM pode, na maioria dos casos, ser desfeito e reconstituído repetidamente, ou seja, é termorreversível (ROLIN, 1993).

Pelas características de sua geleificação, pectinas LM podem ser usadas em produtos com baixo teor de açúcar, tais como géis e geléias de baixo teor calórico, produtos de confeitaria, e outras aplicações que envolvam restrição no conteúdo de açúcar. A reversibilidade térmica de géis LM permite o uso destes em geléias e géis para vitrificação, recheios e coberturas de produtos de padarias e confeitarias que passam por procedimentos de esterilização ou pasteurização, ou ainda aquecimento em microondas (IGLESIAS; LOZANO, 2004).

As pectinas comerciais LM podem ser obtidas através da desesterificação de pectinas HM por tratamento com ácidos, álcalis, amônia ou enzimas (MAY, 1990).

Uma vez que as características dos géis de pectina podem determinar diferentes tipos de aplicações, a análise de suas propriedades físico-químicas torna-se um passo imprescindível para a sua adequada utilização.

## 2.2 AMIDO

O amido é o principal polissacarídeo de reserva de muitas plantas, encontrado na forma de grânulos insolúveis em água fria. Ele apresenta propriedades únicas, que determinam sua funcionalidade em muitas aplicações alimentícias, tanto como fonte de energia na dieta humana quanto como agente para textura (Van HUNG; MAEDA; MORITA, 2006; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Do ponto de vista comercial, os dois aspectos mais importantes do amido são o seu custo, e o fato de sua ocorrência em forma de grânulos, num arranjo que fornece propriedades distintas das outras gomas. Além de ser utilizado na forma nativa, o amido pode ser modificado quimicamente gerando novas possibilidades de aplicações (BeMILLER, 1993).

Grãos de cereais, sementes de leguminosas, tubérculos e certos frutos contêm de 30 a 85% de amido em relação ao peso seco. A principal fonte comercial de amido é o milho amarelo, seguido da batata. Em menores quantidades ele é obtido do trigo, da mandioca, do arroz e do sorgo. Entre as frutas e verduras, o amido pode desaparecer com o amadurecimento (BeMILLER, 1993; MEYER, 1960; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Amidos de cereais, raízes e tubérculos vêm sendo extensivamente estudados, mas poucos estudos têm sido feitos na caracterização de amidos de frutos, alguns destes incluindo a maçã e a abóbora (STEVENSON; DOMOTO; JANE, 2006; STEVENSON *et al.*, 2005).

Há numerosos amidos que se diferenciam de acordo com suas origens e modos de obtenção. Estas diferenças englobam a morfologia dos grânulos (tamanho e forma), o peso molecular, a composição (grau de ramificação das macromoléculas polissacarídicas) e as propriedades físico-químicas (organização molecular complexa e propriedades em solução) (BeMILLER, 1993; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

O amido é uma mistura de polissacarídeos, os quais apresentam na sua composição dois tipos de polímeros da glucose: amilose e amilopectina, cujas proporções típicas variam entre 25-28 e 72-75%, respectivamente, dependendo da origem (Van HUNG; MAEDA; MORITA, 2006; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

A razão amilose: amilopectina determina muitas propriedades de géis de amido, tais como limpidez, viscosidade, textura, tendência à retrogradação, e habilidade de resistir a ácidos, agitação e extremos de temperatura (BeMILLER, 1993).

A amilose é uma molécula essencialmente linear, consistindo de unidades piranosídicas de D-glucose ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), com uma pequena quantidade de ramificações (cerca de 10 pontos de ramificação por macromolécula) em ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Van HUNG; MAEDA; MORITA, 2006; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Em contraste, a amilopectina é uma molécula altamente ramificada. É composta de cadeias de unidades piranosídicas de D-glucose ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), de vários comprimentos, unidas por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) a outras cadeias semelhantes (BeMILLER, 1993; Van HUNG; MAEDA; MORITA, 2006; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Nos amidos nativos, ambas as moléculas estão organizadas em micelas com quantidades limitadas de água, formando os grânulos. Estes grânulos são densos,

insolúveis em água, somente pouco hidratados e esferocristalinos (BeMILLER, 1993; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Quando o amido é misturado com água fria, os grânulos não se dissolvem, apenas embebem água reversivelmente e incham suavemente, de modo que nenhuma mudança aparente na estrutura e na viscosidade acontece (BeMILLER, 1993; MEYER, 1960).

Quando a mistura é submetida a aquecimento, os grânulos se incham rapidamente, ocorre liberação das moléculas de amido mais solúveis, quebra de pontes de hidrogênio, perda da birrefringência e solubilização, causando mudanças aparentes e irreversíveis nos grânulos. O inchamento prossegue, e os grânulos ficam ainda maiores e finalmente se rompem, liberando mais amido no líquido circulante. As moléculas de amido de grânulos adjacentes se atraem e se prendem umas às outras, levando ao aumento da viscosidade da mistura. Se a concentração de amido é suficientemente alta, um gel é formado através de uma rede tridimensional de moléculas de amido, em especial nas cadeias lineares longas de amilose, que se entrelaçam por forças atrativas (BeMILLER, 1993; MEYER, 1960; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Muitas vezes, se a suspensão de amido não forma gel na temperatura elevada, ele será formado quando a mistura é resfriada. O processo de formação de gel de amido é chamado de gelatinização e depende de vários fatores. A temperatura na qual a gelatinização se inicia e as mudanças exatas no decorrer da gelatinização são características primeiramente, da variedade do amido. O pH, a temperatura e o tempo de aquecimento são importantes, e a gelatinização também é influenciada pelo tamanho e forma dos grânulos e pela concentração de amido (BeMILLER, 1993; MEYER, 1960).

Géis de amido podem ser facilmente desfeitos por forças de cisalhamento e são reduzidos a líquidos sendo chamados géis tixotrópicos. Este fenômeno é muitas vezes importante na preparação de alimentos, uma vez que a agitação rompe o gel, e em repouso, o gel se refaz (KHONDAR *et al.*, 2007; MEYER, 1960; ROSALINA; BHATTACHARYA, 2002; ZOBEL; STEPHEN, 1995).

As propriedades do amido estão diretamente relacionadas à sua origem e composição, e suas características, assim como para outras gomas, podem ser avaliadas através da reologia.



## 2.3 POLISSACARÍDEOS E REOLOGIA

A maioria das aplicações práticas dos polissacarídeos envolve sua habilidade de alterar as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferir alta viscosidade a soluções ou por criar redes intermoleculares coesivas (MORRIS, 1995).

A formação de géis é um processo muito importante, pois a estrutura do gel influencia as propriedades das células vivas (animais e vegetais) e também o processamento dos mais diversos produtos, de modo que propriedades reológicas dos polissacarídeos têm despertado grande interesse ao longo dos anos (MEYER, 1960; MORRIS, 1995).

### 2.3.1 Reologia, viscosidade e comportamento de fluidos

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria sob influência de tensões. O comportamento reológico dos materiais está relacionado com suas respostas a uma tensão aplicada e depende do tempo do processo de deformação (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

A propriedade física de um líquido de resistir ao fluxo induzido pela tensão aplicada (cisalhamento) é descrita pela viscosidade. Ela é dependente da natureza físico-química da substância, da temperatura, da pressão, da taxa de cisalhamento e do tempo (SCHRAMM, 2006).

Isaac Newton foi o primeiro a expressar a lei básica da viscosimetria (1687), onde a viscosidade ( $\eta$ ) está relacionada à tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e à taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) de acordo com a equação:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

A tensão de cisalhamento refere-se à força aplicada tangencialmente sobre uma área e sua unidade é o Pascal ( $\text{Pa} = \text{N/m}^2$ ). Considerando-se o modelo onde

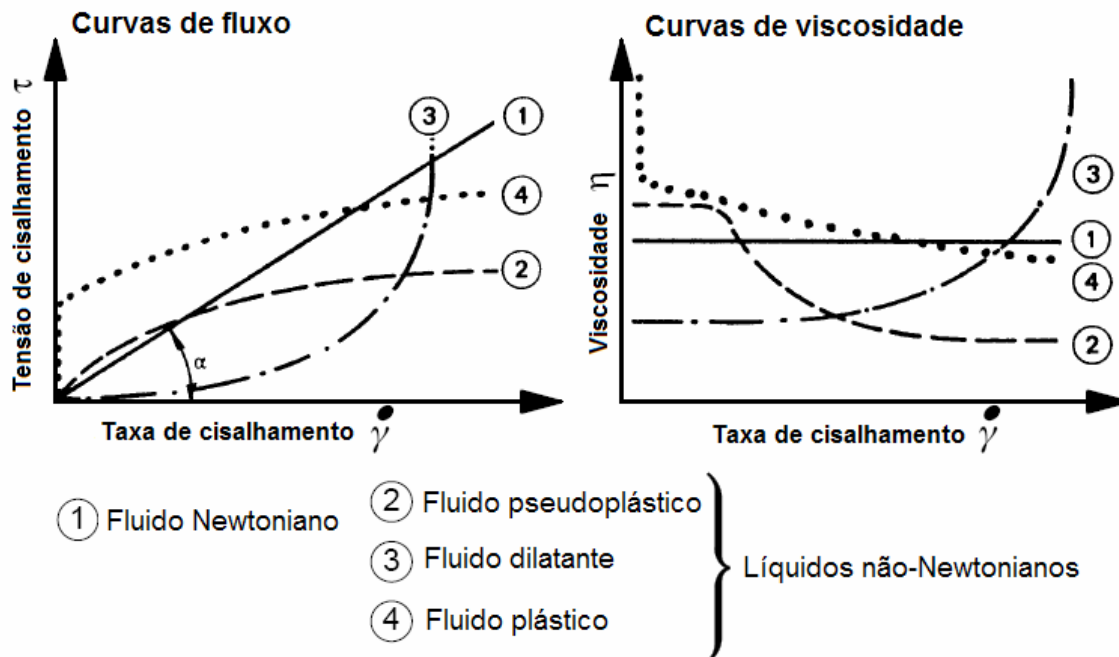
um fluido é mantido entre duas placas paralelas, onde a superior é móvel e a inferior estacionária, ao se aplicar paralelamente uma força  $F$  na placa superior, a velocidade do fluxo gerado é máxima na camada ligada diretamente à placa móvel e decresce paralelamente através das camadas adjacentes do fluido, até chegar a zero na camada ligada à placa estacionária. Isso ocorre devido à resistência interna do fluido, ou seja, sua viscosidade (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

O fluxo de líquidos em camadas paralelas infinitamente finas que deslizam umas sobre as outras arrastando consigo as camadas adjacentes é chamado de fluxo laminar. Com o tempo, as camadas líquidas sofrem deformação, e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo é chamada de taxa de cisalhamento e sua unidade é  $s^{-1}$ . Matematicamente, a taxa de cisalhamento é definida pela velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas, indicando a rapidez com que o líquido flui ao se aplicar uma tensão de cisalhamento sobre ele (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHOTT, 1992; SCHRAMM, 2006).

A viscosidade ( $\eta = \tau / \dot{\gamma}$ ) tem como unidade  $N/m^2.s$ , que equivale à Pa.s.

Para os fluidos que seguem a lei de Newton da viscosimetria a viscosidade não varia com as mudanças na taxa de cisalhamento, ou seja, a viscosidade é uma constante da relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento. Esses líquidos são conhecidos por líquidos Newtonianos e a água é um deles. Entretanto, a maioria das soluções não apresenta este comportamento, sendo denominados líquidos não-Newtonianos, onde a viscosidade é uma função da tensão e da taxa de cisalhamento (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

Os líquidos não-Newtonianos, sob certas condições de tensão e taxa de cisalhamento, independentemente do tempo, podem ter um comportamento de fluxo pseudoplástico (*shear thinning*), dilatante (*shear thickening*) ou plástico, conforme demonstrado na Figura 3.



**Figura 3** - Tipos comuns de comportamento de fluxo  
ADAPTADO DE: SCHRAMM (2006).

Os líquidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, que depende principalmente da orientação/alinhamento de moléculas ou partículas na direção do fluxo, superando o movimento Browniano de moléculas. Em taxas de cisalhamento muito baixas, o movimento Browniano das moléculas as mantém numa ordem interna irregular, sem alteração significativa da estrutura tridimensional, apesar dos efeitos iniciais da orientação de cisalhamento. Deste modo, o líquido apresenta um comportamento semelhante ao dos líquidos Newtonianos, com a viscosidade independente da taxa de cisalhamento. Quando o cisalhamento excede o efeito aleatório do movimento Browniano, a viscosidade cai drasticamente pela indução do alinhamento das moléculas na direção do fluxo. Em taxas de cisalhamento extremamente altas, a viscosidade se aproxima a um nível finito constante. Taxas de cisalhamento ainda maiores não são mais capazes de reduzir a viscosidade, pois o ótimo da orientação/alinhamento das moléculas foi alcançado. Este alinhamento se perde quando o cisalhamento diminui ou é interrompido. Dentre os líquidos pseudoplásticos estão diversas substâncias de alta importância técnica e comercial, tais como soluções poliméricas, emulsões, suspensões ou dispersões (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHOTT, 1992; SCHRAMM, 2006).

A redução da viscosidade em função da taxa de cisalhamento torna-se importante quando se aumenta a concentração do polímero e a massa molecular. Exceto para concentrações baixas de hidrocolóides, a viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento e diminui com o aumento desta, ou seja, o comportamento é pseudoplástico (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996).

Os líquidos dilatantes, apesar de pouco comuns, são encontrados, por exemplo, em suspensões altamente concentradas em partículas sólidas, que não apresentam tendência de associação, desde que a quantidade de líquido presente não seja muito maior que a quantidade necessária para preencher os espaços vazios entre elas. Eles mostram um aumento da viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta, pois as partículas exigem um espaço maior para o movimento, e havendo líquido disponível para ocupar os novos espaços, o fluido se dilata (SCHOTT, 1992; SCHRAMM, 2006).

Os fluidos plásticos não fluem até que uma tensão de cisalhamento crítica (*yield point*) seja excedida. O sistema em repouso apresenta um caráter sólido, com uma viscosidade extremamente alta em razão das forças das ligações intermoleculares, as quais restringem mudanças de posição de elementos de volume, e impedem o fluxo. Quando a força externa excede as forças das ligações, verifica-se um ponto de ruptura, onde a estrutura entra em colapso, os elementos de volume podem mudar de posição irreversivelmente, o sólido se torna líquido e começa a fluir. Em outras palavras, a plasticidade descreve líquidos pseudoplásticos com limite de escoamento, tais como graxa, massas para batom, pasta de dentes e borrachas naturais (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHOTT, 1992; SCHRAMM, 2006).

Fluidos não-Newtonianos cujo comportamento reológico é dependente do tempo de cisalhamento são classificados em tixotrópicos ou reopéticos. No primeiro caso, observa-se uma redução na viscosidade durante o tempo de cisalhamento. Quando o cisalhamento é reduzido gradativamente até a condição inicial, o fluido será menos viscoso ao chegar ao valor mínimo de tensão de cisalhamento. Já os líquidos reopéticos, também conhecidos como anti-tixotrópicos, apresentam o comportamento oposto (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

### 2.3.2 Viscoelasticidade e soluções poliméricas

A grande maioria dos fluidos apresenta um comportamento reológico que os classifica entre os líquidos e sólidos: eles são chamados de viscoelásticos. Deste modo, a viscosidade e a elasticidade são duas possibilidades de resposta à tensão a que são submetidos. O comportamento sólido (distensão) ou líquido (fluxo) vai depender das características relacionadas ao tempo natural de relaxação e ao tempo de duração do experimento (SCHRAMM, 2006).

Nas soluções poliméricas, como aquelas contendo polissacarídeos, o comportamento é dominado pelo fenômeno viscoelástico. Cada molécula flexível espalha-se num volume médio muito maior que as dimensões de suas unidades repetitivas e está continuamente mudando a forma de seu contorno com sua energia térmica. Estas moléculas apresentam-se num estado mínimo de energia. Uma deformação alonga a molécula ou seus segmentos na direção da força aplicada e parte da energia aplicada é armazenada (propriedade de sólidos) e outra parte é dissipada como calor (propriedade de líquidos). O estiramento aumenta os ângulos de ligação e o estado de energia das moléculas. Quando a força da deformação é removida, estas tentam retornar à conformação inicial e ao estado de menor energia (FERRY, 1980; SCHRAMM, 2006).

As moléculas de cadeia longa não atuam sozinhas em um espaço vazio: o que realmente ocorre é que milhões de moléculas similares se entrelaçam, produzindo uma ação intermolecular. Algumas junções não permanentes são formadas nos pontos de entrelaçamento, formando uma rede extensa de cadeias que se conectam por segmentos moleculares (SCHRAMM, 2006).

A investigação do comportamento viscoelástico em testes reológicos requer a aplicação de uma força sobre o material sob investigação e a medição de sua deformação, ou, equivalentemente, a aplicação de uma deformação e a medida da sua resistência. Em análises em sistemas viscoelásticos lineares, uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a resistência à deformação é medida. Deformações ideais esperadas devem ser inferiores a 10% (MORRIS, 1995; NAÉ, 1993).

Em viscoelasticidade existem limites para o uso do reômetro, distinguindo-se viscoelasticidade linear de não-linear. Na primeira, há uma relação linear entre a

deformação sofrida e a tensão aplicada ao material, ou seja, a deformação é, a qualquer tempo, proporcional à tensão aplicada e não há alteração da estrutura original da amostra. Geralmente as tensões que mantêm as amostras dentro de sua faixa de viscoelasticidade linear são pequenas (SCHRAMM, 2006).

Na viscoelasticidade não-linear a amostra é deformada até o ponto em que ligações internas temporárias de moléculas ou agregados são destruídas, ocorre perda de viscosidade e grande parte da energia introduzida é irreversivelmente perdida como calor. Os dados obtidos não são absolutos, e desta forma não serão reproduzíveis em outro reômetro (SCHRAMM, 2006).

A consequência da importância da faixa de viscoelasticidade linear é que qualquer teste dinâmico para amostras desconhecidas deve começar com uma varredura de tensão, onde poderá ser determinada a amplitude que mantém a região de viscoelasticidade linear para a amostra, e assim pode-se proceder a outros testes reológicos para verificar o comportamento da amostra (SCHRAMM, 2006).

Em sistemas reais de polissacarídeos, com comportamento viscoelástico, o caráter sólido e o líquido podem ser quantificados, respectivamente, através do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ), ambos expressos em Pascal (Pa) e que são componentes do módulo de cisalhamento complexo ( $G^*$ ), que representa a resistência total à deformação (NAÉ, 1993).

O módulo de armazenamento,  $G'$ , também denominado módulo de cisalhamento elástico, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada em fase; indica que a energia de tensão é armazenada temporariamente durante o teste e pode ser recuperada mais tarde (MORRIS, 1995; SCHRAMM, 2006).

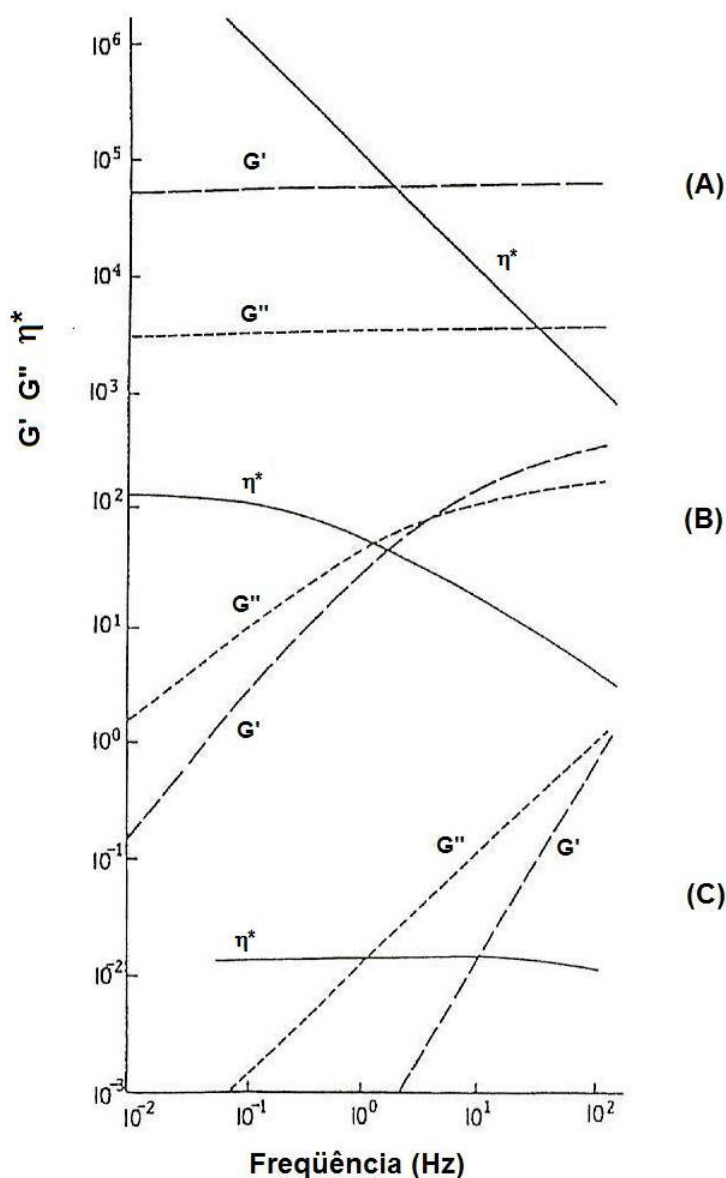
O módulo de perda,  $G''$ , também denominado módulo de cisalhamento viscoso, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada fora de fase; faz alusão ao fato de que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente dissipada ou perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento (MORRIS, 1995; SCHRAMM, 2006).

O módulo de cisalhamento complexo ( $G^*$ ), por sua vez, pode definir uma viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$ , considerada análoga da viscosidade absoluta  $\eta$ , sendo a razão entre  $G^*$  e a frequência ( $f$ ). A frequência, expressa em Hz, pode ser considerada como análoga da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) (SCHRAMM, 2006).

O estudo do comportamento viscoelástico dos diferentes sistemas é baseado

na dependência de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1995).

Numa varredura de frequência, a frequência da deformação é aumentada passo a passo. A Figura 4 mostra a representação gráfica para sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas.



**Figura 4** - Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (A) gel forte; (B) solução concentrada; (C) solução diluída  
ADAPTADO DE: MORRIS (1995).

A Figura 4(A) representa um perfil característico de um gel de polissacarídeo. O módulo  $G'$  é muito maior que  $G''$  em toda a faixa de frequência utilizada no

experimento, isto é, apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos  $G'$  e  $G''$  são essencialmente independentes da frequência, como esperado para uma rede elástica. Quanto maior o valor de  $G'$ , maior é o caráter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; RAO, 1992; WALTER, 1998). A viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$  diminui linearmente com aumento da frequência (MORRIS, 1995).

Soluções concentradas de polímeros apresentam comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido em baixas frequências, onde há predomínio de  $G''$ , devido à reorganização da rede enquanto a frequência é baixa (Figura 4(B)). Quando a frequência vai aumentando em relação à reorganização molecular, ocorre distorção da rede, com  $G'$  aumentando mais rapidamente que  $G''$ . Deste modo, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam em determinado ponto, que é o ponto de geleificação, a partir do qual  $G'$  é maior que  $G''$  e há predomínio do caráter sólido (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1984).

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na Figura 4(C), onde o módulo  $G'$  é significativamente mais baixo que o módulo  $G''$ , e ambos tendem a zero quando a frequência tende a zero. Em baixas frequências predomina o movimento translacional, onde a energia é dissipada por entre o solvente. Em frequências mais altas, ocorre maior movimento de contorção das cadeias e armazenamento de energia, e  $G'$  aproxima-se de  $G''$ . A viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$  apresenta um comportamento essencialmente linear com o aumento da frequência (MORRIS, 1984).

Deste modo, a variação de  $G'$  e  $G''$  e  $\eta^*$  com a frequência permite caracterizar o comportamento viscoelástico dos sistemas polissacarídicos.

## 2.4 CUPUAÇU

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma espécie nativa pertencente à família Sterculiaceae, a mesma família do cacau (*Theobroma cacao* L.). A árvore (Figura 5) cresce espontaneamente no sul e sudoeste do Pará, onde pode ser ainda encontrada em estado silvestre na mata virgem alta de várias



localidades e chega a atingir até 18 metros de altura. O cupuaçu é freqüentemente cultivado em quase toda a área amazônica, incluindo a porção noroeste do Maranhão, mas nestes casos, a árvore apresenta até 8 metros de altura. Fora do Brasil, o cultivo ocorre em países tropicais americanos, como a Venezuela, Equador, Costa Rica e Colômbia. A frutificação acontece no primeiro semestre do ano, com o pico nos meses de fevereiro a abril (CAVALCANTE, 1991; VENTURIERI, 1993).



**Figura 5** - Árvore de *Theobroma grandiflorum*, e seu fruto, o cupuaçu  
FONTE: REISDORFF (2007).

Os frutos, de epicarpo lenhoso, apresentam forma elipsóide ou oblonga, com as extremidades arredondadas ou obtusas, variando de 12 a 25 cm de comprimento e 10 a 12 cm de diâmetro e chegam a pesar até 1,5 kg (Figuras 5 e 6). Sua polpa, que contém vitamina C, é ácida ( $\text{pH} \cong 3,2$ ) e fibrosa, com coloração amarelo-clara e com um agradável e pronunciado aroma, sendo amplamente consumida em refrescos, sorvetes, geléias, compotas, iogurtes e doces (AZEVEDO; KOPCAK; MOHAMED, 2003; CAVALCANTE, 1991; CHAAR, 1980; VIEIRA; TEIXEIRA; SILVA, 2000). Existem ainda muitas outras formas de utilizar a polpa do cupuaçu, como em recheios de balas e bombons, bolos e tortas, pudim, creme nevado, suco

concentrado, licor e, apesar de menos preferida, *in natura* (CAVALCANTE, 1991).

Os compostos voláteis presentes na polpa do cupuaçu vêm sendo extensivamente estudados (ALVES; JENNINGS, 1979; BOULANGER; CROUZET, 2000; FISCHER; HAMMERSCHIMDT; BRUNHE, 1995; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; QUIJANO; PINO, 2007) e dentre eles destacam-se o etil butanoato, o etil hexanoato (ALVES; JENNINGS, 1979; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; QUIJANO; PINO, 2007), e o linalool (QUIJANO; PINO, 2007).



**Figura 6** - Fruto de cupuaçu aberto (*Theobroma grandiflorum*)  
FONTE: TISKITA (2008).

As sementes do cupuaçu, que são envolvidas pela polpa, contêm um alto teor lipídico (cerca de 60%) (MEDEIROS *et al.*, 2006; VENTURIERI; AGUIAR, 1988). A gordura das sementes do cupuaçu é muito semelhante à manteiga do cacau e sua aplicação na indústria de doces é muito interessante. Elas podem ser processadas para produzir, de forma semelhante ao cacau, o chocolate de cupuaçu ou cupulate, o qual apresenta um bom potencial de mercado como um substituto do chocolate (MEDEIROS *et al.*, 2006; NAZARE, 1992).

Embora já se tenham estudos sobre a composição das sementes de cupuaçu (AZEVEDO; KOPCAK; MOHAMED, 2003; CHAISERI *et al.*, 1989; VASCONCELOS *et al.*, 1975) e sobre as pectinas da casca do cacau (MOLLEA; CHIAMPO; CONTI, 2007), pertencente à mesma família do cupuaçu, após ampla revisão bibliográfica, não foi encontrado nenhum artigo a respeito dos polissacarídeos dos frutos do cupuaçu. Sendo assim, neste trabalho isolou-se e caracterizou-se os polissacarídeos de sua polpa, em especial as pectinas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos estruturais e reológicos de polissacarídeos extraídos da polpa dos frutos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter os polissacarídeos da polpa dos frutos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) através de extrações seqüenciais aquosas, ácidas e alcalinas;
- ✓ Caracterizar as frações obtidas quanto à composição monossacarídica;
- ✓ Caracterizar as frações pécticas obtidas quanto ao grau de esterificação;
- ✓ Caracterizar estruturalmente a fração péctica de maior rendimento;
- ✓ Analisar o comportamento reológico das frações de maior rendimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)

Os frutos frescos inteiros de cupuaçu foram adquiridos por Ari Zugman em um mercado em Belém (Pará), trazidos até Curitiba e mantidos sob refrigeração até o processamento.

### 4.2 ISOLAMENTO DA POLPA DO CUPUAÇU, INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E DESLIPIDIFICAÇÃO

Os frutos inteiros lavados (~5,3 kg) foram despulpados e a polpa obtida (~2,2 kg) foi triturada em liquidificador e submetida à inativação enzimática numa mistura de metanol-água (4:1) em ebulição sob refluxo por 20 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, o material foi centrifugado. O sobrenadante foi concentrado e congelado, e o resíduo foi lavado com etanol, e seco em estufa a vácuo. Após trituração, o resíduo foi deslipidificado com uma mistura de tolueno: etanol (2:1, v/v), por aproximadamente 60 horas, em aparelho extrator de Soxhlet. O resíduo seco foi então utilizado para a extração dos polissacarídeos.

### 4.3 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO CUPUAÇU

Foram utilizados solventes e reagentes com grau de pureza PA-ACS.

As etapas de extração foram realizadas em agitador mecânico FISATON 713.

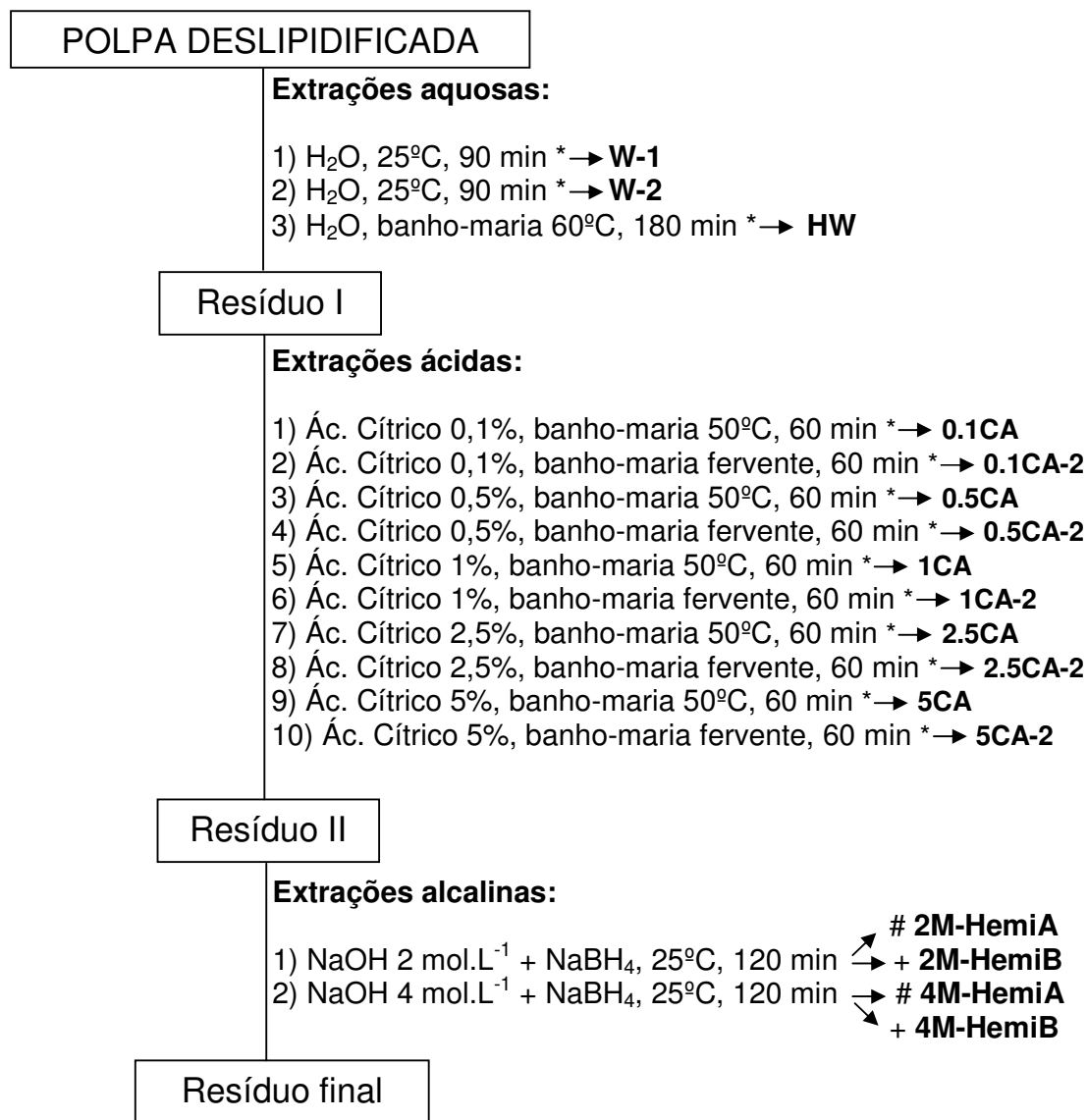
As etapas de centrifugação foram realizadas em centrífugas HITACHI HIMAC CR 21E e SORVALL T6000D. A secagem sob pressão reduzida foi efetuada em estufa EDGCON 5P a 25°C.

As determinações de pH foram realizadas em um equipamento QUIMIS digital, modelo Q400A.

Para a remoção dos solventes foi utilizado evaporador rotatório, a vácuo, em temperatura inferior a 50°C.

O material deslipidificado foi submetido ao esquema de extrações representado na Figura 7. As sucessivas extrações foram realizadas em agitador mecânico. Após cada extração, as dispersões foram centrifugadas a 15400xg por 20 minutos, separando o sobrenadante do resíduo, que era utilizado para as extrações subseqüentes. O sobrenadante das extrações foi concentrado e os polissacarídeos foram precipitados utilizando dois volumes de etanol. O material precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto e então seco em estufa a vácuo, originando a respectiva fração.

As extrações aquosas seqüenciais foram efetuadas em temperatura de 25°C (90 minutos, 2x) e em banho-maria a 60°C (180 minutos). As extrações ácidas seqüenciais foram feitas com ácido cítrico em diferentes concentrações (0,1%; 0,5%; 1%; 2,5% e 5%) e em temperaturas distintas para cada concentração (banho-maria a 50°C e banho-maria fervente), por 60 minutos. As extrações alcalinas foram realizadas com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> e 4 mol.L<sup>-1</sup> (25°C, 120 minutos) na presença de NaBH<sub>4</sub>, e depois da separação do extrato, este foi neutralizado com solução de ácido acético a 50% (v/v). Ocorreu precipitação de polissacarídeos, e estes foram separados por centrifugação e denominados HemiA, e o sobrenadante resultante foi dialisado, concentrado e então precipitado, originando a fração HemiB.



**Figura 7** - Procedimento de extração dos polissacarídeos da polpa do cupuaçu

\*: Centrifugação, separação do resíduo para extração seguinte, e precipitação do extrato com etanol.

#: Centrifugação, separação do resíduo para extração seguinte, neutralização do extrato e nova centrifugação, obtendo-se o precipitado (HemiA) e o sobrenadante.

+: Diálise do sobrenadante da HemiA, e precipitação do extrato com etanol após concentrá-lo.

#### 4.4 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

Após obtenção das frações, as mesmas foram secas a vácuo, e o rendimento calculado. Em seguida as frações foram analisadas quanto ao seu teor em açúcar total, ácidos urônicos e proteínas. Todas as análises foram efetuadas em triplicata. A absorbância foi medida em espectrofotômetro SP-22 Biospectro®.

Açúcares totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), leitura efetuada em comprimento de onda de 490 nm, utilizando como padrão solução de glucose nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada através do método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e leitura em 525 nm.

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Hartree (1972) sendo a leitura efetuada em 650 nm. O padrão empregado foi soroalbumina bovina (BSA-SIGMA) nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A dosagem de acetil foi efetuada de acordo com Hestrin (1949), utilizando como padrão soluções de eritritol tetraacetato nas concentrações de 0,05-5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e leitura em 540 nm.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

##### 4.5.1 Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas totais das frações obtidas foram realizadas com ácido trifluoracético (TFA) 2  $\text{mol.L}^{-1}$  em tubo hermeticamente fechado, a 100°C, durante 5 horas. Após a hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989). O material hidrolisado foi lavado duas vezes com água destilada, e esta evaporada.

A hidrólise ácida total do resíduo final foi efetuada de acordo com Saeman *et al.* (1954), em tubo hermeticamente fechado. Utilizou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (p/p) em banho de gelo por uma hora, com agitações, seguido de diluição para 8%, a 100°C, durante 15 horas. Após a hidrólise, o ácido sulfúrico foi neutralizado com  $\text{BaCO}_3$  e o sal resultante foi removido por filtração.

#### 4.5.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida total foram reduzidos com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) em temperatura ambiente por 16 h em meio aquoso (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os íons hidreto ( $\text{H}^-$ ) fornecidos pelo agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) promovem redução dos grupamentos carbonila dos monossacarídeos, formando alditóis.

Em seguida adicionou-se resina Lewatit S-100 (resina trocadora de cátions na forma ácida) para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions  $\text{Na}^+$ .

A solução foi filtrada em algodão e o filtrado evaporado até a secura. Lavagens sucessivas com 3 mL de metanol (3 vezes) foram feitas para remover o ácido bórico remanescente por co-distilação, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (agente catalisador) - anidrido acético (agente acetilante) (1:1 v/v), em tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 16 h a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

Este processo foi interrompido por adição de gelo moído ao sistema, e os acetatos de alditóis foram extraídos com 1 mL de clorofórmio. A piridina residual foi complexada com solução aquosa de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) a 5% (p/v), sendo assim separada da fase clorofórmica e eliminada por sucessivas e intercaladas lavagens com água destilada e  $\text{CuSO}_4$ .

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada, e após secura, a amostra foi ressolubilizada em acetona para ser analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram efetuadas em cromatógrafo gasoso Hewlett Packard modelo 5890 A Série II, com detector de ionização de chama (FID) e injetor à temperatura de 250°C, coluna capilar DB-210 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), com espessura de filme de 0,25µm a 220°C, e nitrogênio como gás de arraste em fluxo de 2,0 mL.min<sup>-1</sup> (SLONEKER, 1972).



#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ )  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 200 ppm, em concentração de  $1\text{-}3 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e filtradas em membrana de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de  $0,2 \mu\text{m}$ .

As amostras foram injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters, equipado com um detector de índice de refração diferencial (RI) Waters modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) Wyatt Technology modelo Dawn DSP, com 18 canais acoplados em série. Utilizou-se 4 colunas de gel permeação Waters em série, com limites de exclusão de  $7.10^6$ ,  $4.10^5$ ,  $8.10^4$  e  $5.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ . As análises foram efetuadas a  $25^\circ\text{C}$  utilizando como eluente solução de  $\text{NaNO}_2$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm, com fluxo de  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ , monitorado através de bomba peristáltica Waters 515.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS

O grau de esterificação das pectinas foi determinado através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR - Fourier transform-infrared), em espectrofotômetro BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canadá).

Os espectros foram coletados no modo de absorbância na frequência de  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ , numa resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Utilizou-se brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico e preparou-se cada pastilha usando uma proporção de 90:10 (p/p) de KBr:amostra. Como branco empregou-se uma pastilha de KBr, para correção da absorção do  $\text{CO}_2$  e mistura de ar antes das análises (KALAPATHY; PROCTOR, 2001; MONSOOR, 2005).

Padrões de pectinas com grau de esterificação de 22 e 89% foram adquiridos da SIGMA (Alemanha). Pectinas padrão com diferentes graus de esterificação (35, 44, 55, 66 e 75%) foram preparadas misturando-se quantidades apropriadas dos

dois padrões. Para cada padrão de pectinas, duas amostras independentes foram preparadas, seus espectros de FT-IR foram obtidos e as áreas dos picos correspondentes aos grupos carboxílicos esterificados ( $1749\text{ cm}^{-1}$ ) e não-esterificados ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) foram quantificadas utilizando o software do equipamento.

Calculou-se a razão da área da banda dos grupos carboxílicos metil-esterificados ( $1749\text{ cm}^{-1}$  - COO-R) em relação à área total dos grupos carboxílicos [soma das áreas de  $1749\text{ cm}^{-1}$  (COO-R) e  $1630\text{ cm}^{-1}$  (COO<sup>-</sup>)] das duplicatas dos padrões de pectina. Para cada padrão, obteve-se uma média, que foi então plotada contra seu respectivo grau de esterificação. Assim, obteve-se uma curva de calibração para determinar o grau de esterificação (DE) das amostras desconhecidas.

Previamente às análises por FT-IR, o KBr foi desidratado a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, e os padrões de pectinas e as amostras de pectinas com grau de esterificação desconhecido foram dessecadas em pistola a vácuo contendo  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Os espectros de FT-IR das amostras de pectinas foram obtidos exatamente da mesma forma que os espectros dos padrões de pectinas. Para a pesagem das pectinas e do KBr utilizou-se uma balança OHAUS Analytical Plus, com precisão de 0,00001g.

Para confirmação da validade do método, o DE da amostra W-1 foi também determinado utilizando experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$  RMN) em espectrofotômetro BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, incorporando transformador Fourier (FT). A amostra previamente desidratada foi dissolvida em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $10\text{ mg.mL}^{-1}$  e transferida para tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos a  $80^{\circ}\text{C}$  (256 scans). Os deslocamentos químicos dos prótons dos experimentos de  $^1\text{H}$  NMR foram expressos em relação à ressonância do deutério. A quantificação do DE foi feita na região de baixo campo de acordo com Grasdalen; Bakøi e Larsen (1988), empregando-se a seguinte equação:

$$\text{DE (\%)} = \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \times 100$$

Onde o numerador é a soma das intensidades das ressonâncias de H-1 e H-5 em unidades de GalA esterificadas, e o denominador é o total das intensidades destas ressonâncias em unidades esterificadas e livres de GalA.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACETILAÇÃO POR $^1\text{H}$ RMN

O grau de acetilação da fração W-1 foi determinado por experimentos de  $^1\text{H}$  NMR no espectrofotômetro BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, incorporando transformador Fourier (FT). A amostra previamente desidratada (5 mg) foi dissolvida em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos a  $80^\circ\text{C}$  (256 scans). Os deslocamentos químicos dos prótons dos experimentos de  $^1\text{H}$  NMR foram determinados utilizando as seqüências de pulsos convencionais providas pelo equipamento e foram expressos em relação à ressonância do deutério. A quantificação do acetato foi feita em relação ao H-4 do ácido galacturônico, baseando-se no método de Bédouet; Courtois e Courtois (2003).

#### 4.9 CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO W-1

Os grupos carboxílicos das unidades de ácidos urônicos da fração W-1 foram reduzidos às suas correspondentes unidades glicosídicas de 6,6-dideutério por uma variação (STONE; ANDERSON, 1985) do método de Taylor e Conrad (1972).

A fração W-1 (200 mg) foi solubilizada em 7,5 mL de tampão MES (ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico)  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 4,75. A seguir, adicionou-se, aos poucos e sob agitação, 3,266g de 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meta-*p*-toluenossulfonato (CMC). A mistura permaneceu por duas horas sob agitação e então adicionou-se tampão TRIS (ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminioetanossulfônico)  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0 até estabilização do pH da mistura em 7,0 (5,025 mL). Posteriormente, acrescentou-se  $\text{NaBD}_4$  aos poucos, sob agitação, na presença de octanol, até concentração final de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  (1,05g). A mistura permaneceu sob agitação por 16 h e a redução foi interrompida pela adição de ácido acético, em banho de gelo, até pH 5,0. O material foi submetido à diálise em membranas com limite de exclusão de 12000 Da durante 48 h, e então foi congelado e liofilizado. Por fim, o material seco foi lavado três vezes com metanol, ressolubilizado em água destilada, congelado e novamente liofilizado. Devido ao fato de a amostra ainda conter quantidades significantes de ácidos urônicos, o

processo da carboxi-redução foi repetido e as quantidades dos reagentes foram adicionadas proporcionalmente aos teores de ácidos urônicos ainda presentes. A fração carboxi-reduzida assim obtida (148 mg) foi denominada RW-1, e sua composição monossacarídica foi determinada conforme o item 4.5, com a diferença de que a análise foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS), de modo a identificar as unidades de ácidos urônicos da fração pelo perfil de fragmentação.

As análises por GLC-MS foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso Varian 3800 ligado a um espectrômetro de massa Varian 2000 R-12, utilizando hélio como gás de arraste (fluxo de 2.0 mL.min<sup>-1</sup>) e coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), mantida a 50°C durante a injeção, e então programada para 40°C.min<sup>-1</sup> até atingir 220°C (temperatura constante).

#### 4.10 METILAÇÃO

A fração RW-1 foi metilada de acordo com Ciucanu e Kerek (1984). O polissacarídeo (4 mg) foi solubilizado em 0,3 mL de Me<sub>2</sub>SO. Sob agitação, adicionou-se 20 mg de NaOH pulverizado e seco, e a seguir acrescentou-se 0,1 mL de CH<sub>3</sub>I. O material permaneceu sob agitação por 6 minutos e então se acrescentou 1 mL de água destilada e extraiu-se o metilado com 1 mL de clorofórmio (em três vezes). A fase clorofórmica foi lavada três vezes com água destilada (10 mL) e evaporada em atmosfera de nitrogênio. Realizou-se um segundo procedimento de metilação. O material metilado obtido foi hidrolisado com 1 mL de solução de ácido fórmico a 45% (v/v) por 15 h. O material hidrolisado foi congelado, liofilizado, ressolubilizado em água destilada, reduzido por 16 h com NaBD<sub>4</sub> e acetilado (item 4.5.2). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GLC-MS e identificados de acordo com seus tempos de retenção e perfis de fragmentação (CARPITA; SHEA, 1989; JANSSEN *et al.*, 1976).

#### 4.11 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO W-1

A fração W-1 foi solubilizada em água destilada (1:40, p/v) e submetida à digestão enzimática sob agitação para retirada do amido. Foram utilizadas as enzimas amiloglucosidase (Megazyme) e  $\alpha$ -amilase termoestável (SIGMA) dentro das condições recomendadas pelos fabricantes. O acompanhamento da degradação do amido foi realizado pelo teste do lugol. Após 30 minutos a 55°C e pH 5,6 não se verificou mais reação do lugol positiva. A mistura permaneceu por mais 30 minutos nestas condições e depois foi submetida à inativação enzimática através de fervura por 15 minutos. O material foi centrifugado, e o resíduo contendo as enzimas desnaturadas foi descartado. O sobrenadante foi precipitado com dois volumes de etanol e mantido sob refrigeração por 16 h. O material foi então centrifugado, o resíduo lavado com etanol, ressolubilizado e dialisado por 48 h em membranas com limite de exclusão de 12000 Da. Após nova precipitação, a amostra livre de amido foi centrifugada, lavada três vezes com etanol e seca em estufa a vácuo, resultando na fração denominada PW-1.

#### 4.12 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As frações W-1, 0.1CA-2 e PW-1 foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O e as análises efetuadas em tubos de 5 mm de diâmetro. As determinações de RMN foram realizadas no aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400 acoplado a um transformador Fourier, com ressonância de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, de 100 e 400MHz respectivamente, utilizando a temperatura de 70°C para o polissacarídeo. Os deslocamentos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, utilizando a ressonância dos grupos CH<sub>3</sub> da acetona como padrão interno (<sup>13</sup>C,  $\delta$  30.2).

#### 4.13 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES REOLÓGICAS

As soluções poliméricas de pectina (W-1 e PW-1) foram preparadas em pH 3,0 em duas condições diferentes:

- ✓ variando a concentração de sacarose (55, 60 e 65%, p/p) utilizando a concentração fixa de 2% (p/p) da amostra;
- ✓ variando a concentração da amostra (1, 2 e 3%, p/p) com concentração fixa de sacarose (65%, p/p).

As amostras foram primeiramente solubilizadas em água deionizada por agitação por 16 h à temperatura ambiente. A seguir, acrescentou-se a sacarose na proporção adequada, e cada mistura permaneceu sob agitação até máxima solubilização da sacarose. As amostras foram posteriormente submetidas a aquecimento em banho-maria sob agitação e quando sua temperatura atingia 92°C, estas permaneciam por 15 minutos nesta condição, sob agitação. As soluções poliméricas de pectinas com sacarose foram mantidas em repouso até atingir a temperatura ambiente e então o pH foi corrigido para 3,0 com a utilização de uma solução saturada de ácido cítrico. Finalmente, acertou-se o peso final de cada amostra com água deionizada, homogeneizou-se e deixou-se em repouso sob refrigeração por 16 h, para então ser empregada nas análises reológicas.

As soluções poliméricas de amido (0.1CA-2) foram preparadas variando a concentração da amostra (4, 5, 6 e 7%, p/p). Cada amostra foi solubilizada na totalidade da água deionizada para o peso final da solução, por agitação por 16 h à temperatura ambiente. Posteriormente as soluções poliméricas foram submetidas a aquecimento em banho-maria sob agitação e quando sua temperatura atingia 92°C, estas permaneciam por 15 minutos nesta condição, sob agitação. Deixou-se resfriar sob agitação à temperatura ambiente. Mediu-se o pH de cada solução polimérica, que permaneceu em repouso sob refrigeração por 16 h, para então ser empregada nas análises reológicas.

#### 4.14 ANÁLISES REOLÓGICAS

As medidas reológicas foram realizadas em Reômetro Haake Rheostress 75, acoplado a um banho termoestatizado HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5, e a um controlador térmico TC 81 (Peltier), utilizando os sensores cone-placa (C60 2Ti) e placa-placa (PP 20 Ti; PP 35 Ti).

Previamente às análises reológicas, foi determinada a inércia para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. Durante as análises, a temperatura ambiente manteve-se em  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

As soluções poliméricas foram preparadas em diferentes condições para a obtenção de géis, conforme o item 4.13 e as análises foram realizadas a  $25^\circ\text{C}$ . Inicialmente realizou-se uma varredura de tensão na frequência de 1 Hz para verificação da faixa viscoelástica linear e seleção da tensão ou deformação que seriam empregadas nas análises de varredura de frequência e rampas de temperatura, de modo a preservar a estrutura do gel em análise.

As varreduras de frequência foram conduzidas na tensão ou deformação pré-selecionada, aumentando a frequência oscilatória com o tempo, na faixa de 0,1-50 Hz. As curvas de viscosidade foram realizadas a  $25^\circ\text{C}$  na faixa de 0,1-100  $\text{s}^{-1}$ .

O comportamento das amostras foi avaliado frente a variações de temperatura utilizando um programa de aquecimento de  $1^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ , nas temperaturas crescentes de 5- $95^\circ\text{C}$ , seguida de resfriamento de  $95-5^\circ\text{C}$ , em frequência fixa de 1 Hz. Para prevenir a evaporação do solvente foi aplicada uma camada de óleo mineral ao redor da placa de análise.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA DO CUPUAÇU

A polpa do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) foi isolada dos frutos frescos, triturada e imediatamente tratada com metanol-água para inativar as enzimas hidrolíticas que poderiam agir nos polissacarídeos da parede celular, sendo este um passo essencial antes das extrações. Após inativação enzimática, o material foi deslipidificado, totalizando 11,3% de compostos lipossolúveis em relação à polpa seca e inativada, ou 0,51% em relação à polpa fresca.

Frutas e verduras não são comumente tidas como fontes de lipídios, mas a maioria delas contém entre 0,1 e 1% de lipídios totais, normalmente denominados como gordura (MEYER, 1960).

Após a deslipidificação, obteve-se 4% de material seco em relação à polpa fresca inicial e este foi o material de partida para as extrações dos polissacarídeos (Figura 7).

Frações de pectinas são obtidas de parede celular vegetal por extrações seqüenciais com água fria ou quente, soluções tampão, soluções de agentes quelantes a frio ou a quente, soluções de ácidos diluídos a quente, e finalmente soluções diluídas de NaOH a frio ou de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a frio ou a quente (VORAGEN *et al.*, 1995).

Neste trabalho, na tentativa de obter frações pécticas, inicialmente empregou-se a água, que, segundo Voragen e colaboradores (1995), solubiliza pectinas altamente esterificadas, seguida de extrações a quente com ácido cítrico diluído, que extrai pectinas firmemente ancoradas nas paredes celulares. O emprego de soluções ácidas diluídas a quente é utilizado industrialmente para a obtenção das pectinas do bagaço de maçãs e de casca de cítricos (VORAGEN *et al.*, 1995). Já as extrações alcalinas foram realizadas visando obter frações hemicelulósicas da polpa do cupuaçu.



As frações polissacarídicas obtidas foram nomeadas de acordo com as condições de extração. Para as extrações aquosas, os nomes escolhidos foram: W-1 para a primeira extração a 25°C (water-1), W-2 para a segunda extração a 25°C (water-2) e HW para a extração a quente (hot water).

Para as extrações ácidas, os nomes indicam a concentração do ácido cítrico empregado, seguido das iniciais CA (citric acid) para a primeira extração a quente (banho-maria a 50°C), ou CA-2 para a segunda extração a quente (banho-maria fervente), por exemplo, 0.1CA-2 é a fração obtida em banho-maria fervente depois da extração a 50°C empregando ácido cítrico a 0,1%.

Finalmente, para os extratos alcalinos, os nomes iniciam com a concentração de NaOH empregada, seguidos por HemiA se os polissacarídeos precipitaram após neutralização do extrato com ácido acético, ou por HemiB se os polissacarídeos permaneceram no extrato dialisado e precipitaram somente após a adição de etanol.

Deste modo, 17 frações foram obtidas e seus rendimentos e teores de açúcar total e de proteínas estão apresentados na Tabela 1. A composição monossacarídica das frações está mostrada na Tabela 2.

O rendimento dos polissacarídeos extraídos variou de 0,3 a 15% em relação à polpa seca e deslipidificada. O maior rendimento foi obtido na extração com ácido cítrico a 0,1%, por 60 minutos em banho-maria fervente (fração 0.1CA-2). Verificou-se um aumento no rendimento das frações ao se aumentar a temperatura da extração quando a concentração de ácido cítrico permaneceu constante.

**Tabela 1** - Rendimento, teor de carboidratos e de proteínas das frações polissacarídicas obtidas a partir da polpa do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

FRAÇÃO	Rendimento <sup>a</sup>	Açúcar Total <sup>b</sup>	Proteínas <sup>c</sup>
	%		
W-1	7,0	61,0	5,9
W-2	1,0	57,5	12,6
HW	1,5	55,4	15,8
0.1CA	0,5	56,6	13,2
0.1CA-2	14,7	90,8	1,1
0.5CA	1,5	84,0	4,6
0.5CA-2	7,7	93,4	4,3
1CA	0,3	97,8	0,9
1CA-2	4,5	82,4	3,8
2.5CA	0,4	77,1	15,9
2.5CA-2	0,5	43,5	25,2
5CA	0,6	56,6	2,0
5CA-2	1,0	36,9	35,6
2M-HemiA	3,4	19,4	56,1
2M-HemiB	3,7	68,3	13,6
4M-HemiA	1,3	77,4	tr
4M-HemiB	0,4	77,3	12,7

a: em relação à polpa deslipidificada e seca.

b: determinado por método colorimétrico, Dubois *et al.*, 1956.

c: determinado por método colorimétrico, Hartree, 1972.

tr: traços.

A maioria dos rendimentos das frações é comparável aos obtidos para pectinas da polpa do araçá (VRIESMANN *et al.* 2004a), dos frutos do cambuí (VRIESMANN *et al.*, 2004b) e do lúpulo (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002), mas são menores que os rendimentos para as pectinas da polpa da manga (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002), do marmelo (FORNI; PENCI; POLLESELLO, 1994) e da maçã (MARCON, 2004; KRAVTCHENKO; VORAGEN; PILNIK, 1992); e muito menor que aquele encontrado para pectinas extraídas da farinha da casca do maracujá (PINHEIRO, 2007) e para pectinas de cítricos (KRAVTCHENKO; VORAGEN; PILNIK, 1992).

O teor de açúcar total das frações polissacarídicas ficou compreendido entre 19,4% e 97,8%. Em geral, estes valores estão em concordância com os teores encontrados para polissacarídeos extraídos por outros pesquisadores (MARCON, 2004; OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002; REDGWELL; SELVENDRAN, 1986; SANTOS, 2006; VRIESMANN *et al.*, 2004a; VRIESMANN *et al.*, 2004b).

Todas as frações polissacarídicas obtidas da polpa do cupuaçu apresentaram proteínas em diferentes proporções (Tabela 1). Apesar de pectinas de várias fontes serem descritas contendo materiais protéicos (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; MARCON, 2004; OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002; PINHEIRO, 2007; SANTOS, 2006; SINGTHONG *et al.*, 2005; YAPO *et al.*, 2007; YAPO; KOFFI, 2006), os valores encontrados para as frações da polpa do cupuaçu podem estar superestimados, pois compostos fenólicos, quando presentes, interferem no método utilizado (HARTREE, 1972).

A composição das pectinas varia de acordo com a fonte da qual elas são isoladas, bem como com as condições aplicadas durante seu isolamento e purificação (ROLIN, 1993). Frações pécticas são geralmente caracterizadas pela presença predominante de ácido galacturônico (que é o constituinte da cadeia principal), e dos monossacarídeos neutros ramnose, arabinose e galactose, responsáveis pelas ramificações. Diferentes subpopulações pécticas podem ser distinguidas por sua composição monossacarídica e teor de ácidos urônicos (REDGWELL; SELVENDRAN, 1986; VORAGEN *et al.*, 1995).

**Tabela 2** - Composição monossacarídica<sup>a</sup> dos polissacarídeos obtidos da polpa do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

FRAÇÃO	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urônicos <sup>b</sup>
	mol%							
W-1	3,3	0,6	5,9	3,9	1,0	12,8	7,1	65,4
W-2	2,3	1,2	6,6	11,2	2,0	14,2	14,7	47,8
HW	2,8	1,2	6,3	4,7	2,3	14,9	27,1	40,7
0.1CA	1,8	1,2	6,2	24,4	2,3	12,7	24,4	27,0
0.1CA-2	0,6	-	0,4	0,4	0,2	1,0	90,8	6,6
0.5CA	0,7	-	1,0	1,2	-	2,1	79,3	15,7
0.5CA-2	0,8	-	0,6	0,6	0,3	1,5	87,2	9,0
1CA	0,4	0,2	1,1	0,8	1,6	3,1	82,3	10,5
1CA-2	0,3	-	0,4	0,2	0,1	0,4	97,6	1,0
2.5CA	0,7	-	1,5	0,6	1,0	5,2	66,1	24,9
2.5CA-2	0,9	0,4	3,1	1,4	1,3	13,4	65,6	13,9
5CA	3,8	0,7	4,9	1,8	1,8	23,2	19,2	44,6
5CA-2	0,4	-	-	-	4,1	39,5	30,6	25,4
2M-HemiA	0,8	-	-	-	17,2	25,6	56,4	-
2M-HemiB	2,0	-	2,5	40,7	14,2	13,1	25,5	2,0
4M-HemiA	0,5	0,1	3,4	16,8	33,0	11,6	34,6	-
4M-HemiB	1,5	-	8,6	24,0	26,5	11,4	27,0	1,0
Resíduo	1,7	0,1	17,9	5,7	2,0	5,2	67,4	nd

a: determinada por glc, mol%.

b: determinado por método colorimétrico, Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991.

nd: não determinado.

Neste trabalho, a principal fração péctica obtida foi aquela oriunda da primeira extração aquosa (W-1, rendimento de 7% em relação ao peso seco da polpa inativada e deslipidificada ou 0,3% em relação à polpa fresca). Este rendimento foi superior ao encontrado para a pectina solúvel em água extraída da casca do maracujá amarelo (2,9%) por Yapo e Koffi (2006). Como mostrado na Tabela 2, esta fração exhibe o maior teor relativo de ácidos urônicos (65,4 mol%) em comparação com todas as outras frações e foi escolhida para uma melhor caracterização estrutural.

Outras frações com teor considerável de ácidos urônicos e monossacarídeos típicos de pectinas foram W-2, HW e 5CA. As duas primeiras frações apresentaram composições monossacarídicas semelhantes, enquanto a última mostrou maior teor de galactose. O teor de ácidos urônicos encontrado nestas frações (entre 40 e 48 mol%) é comparável àqueles encontrados por Yapó e colaboradores (2007) e Ptitchkina e colaboradores (1994) e é superior aos valores encontrados para as pectinas da polpa do araçá vermelho (SANTOS, 2006) e para as pectinas obtidas da farinha do bagaço da maçã (MARCON, 2004).

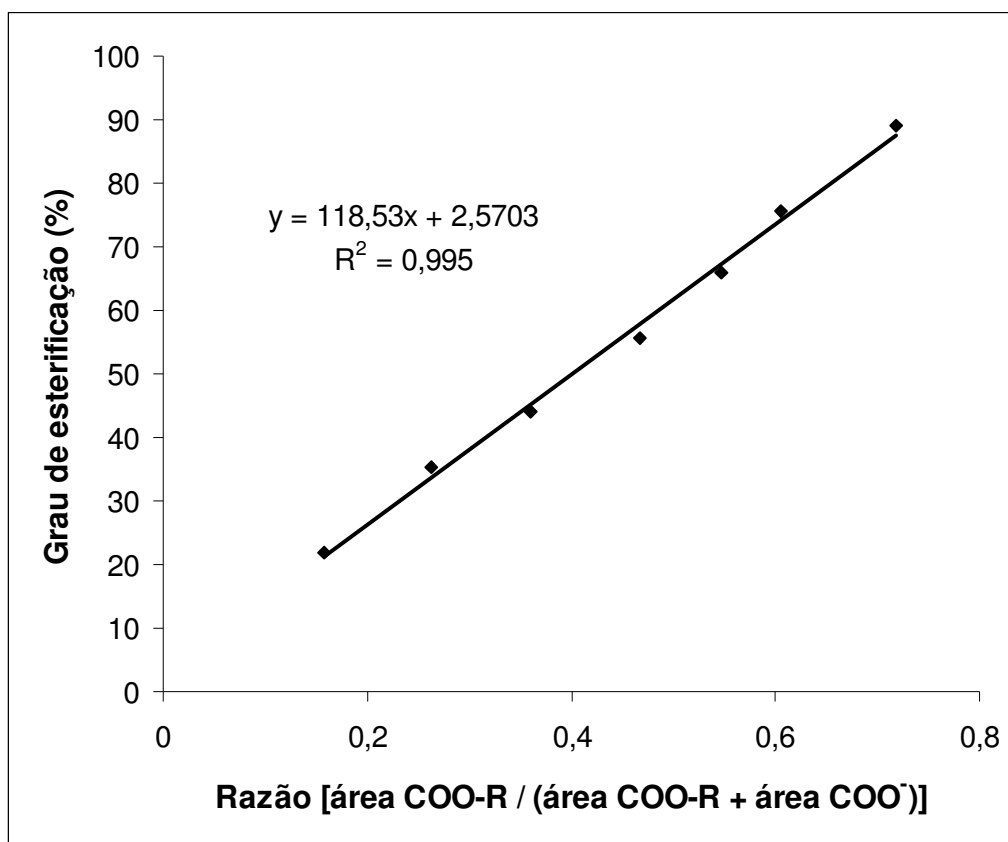
Entre os açúcares neutros que compõem as pectinas, verificou-se que em todas as frações pécticas obtidas da polpa do cupuaçu, a galactose foi o monossacarídeo predominante, com menores quantidades de arabinose. Estes resultados são semelhantes a aqueles obtidos para as pectinas de um tipo de abobrinha (*butter squash fruit*) (O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2007), da polpa de beterraba (YAPO *et al.*, 2007), do lúpulo (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002), de frutos de marmelo (FORNI; PENCI; POLLESELLO, 1994) e da cebola (REDGWELL; SELVENDRAN, 1986). Entretanto, são diferentes dos resultados obtidos para a pectina do maracujá (PINHEIRO, 2007), da polpa do araçá vermelho (SANTOS, 2006), da linhaça (DÍAZ-ROJAS *et al.*, 2004), da casca dos frutos de um cactus (*Opuntia ficus-indica*) (HABIBI *et al.*, 2004), da farinha do bagaço da maçã (MARCON, 2004), do araçá (VRIESMANN *et al.*, 2004a), do limão (ROS; SCHOLS; VORAGEN, 1998), da maçã (SCHOLS *et al.*, 1995c) e do girassol (MIYAMOTO; CHANG, 1992), cujo teor de arabinose é maior que o de galactose. Assim, pode-se sugerir que as ramificações das frações pécticas obtidas da polpa do cupuaçu são constituídas principalmente de galactanas ou arabinogalactanas.

Através de espectroscopia de FT-IR foi possível determinar o grau de esterificação (DE) das pectinas obtidas, como mostrado na Tabela 3. As principais vantagens da espectroscopia no infravermelho (FT-IR) sobre os outros métodos existentes para determinação do grau de esterificação de moléculas de pectinas são a sua simplicidade, a rapidez de cada análise e a não-destruição das amostras, além de permitir a identificação dos principais grupos funcionais presentes nas moléculas a partir de uma pequena porção de amostra (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; VIGNON; GARCIA-JALDON, 1996).

Espectros de FT-IR de pectinas mostram bandas mais intensas entre 1760-1730  $\text{cm}^{-1}$ , e 1630-1600  $\text{cm}^{-1}$ : a banda em 1760-1730  $\text{cm}^{-1}$  representa os grupos

carboxílicos esterificados, enquanto que a banda em  $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  representa os grupos carboxílicos livres (CHATJIGAKIS *et al.*, 1998; MANRIQUE; LAJOLO, 2002; SINGTHONG *et al.*, 2004). Com o aumento do DE, a intensidade da absorbância ou área da banda dos grupos carboxílicos esterificados aumenta, enquanto a intensidade da absorbância ou área da banda estendida do carboxilato diminui. De maneira semelhante, a intensidade da absorbância ou área da banda dos grupos carboxílicos livres (íons carboxilato) aumenta com o decréscimo do DE. Estas observações estabeleceram a base para a análise quantitativa do grau de esterificação de pectinas por FT-IR (SINGTHONG *et al.*, 2004).

O DE das pectinas foi quantificado pelo uso de uma curva de calibração construída com base em padrões de pectina com DE conhecido. As áreas de interesse foram obtidas pelo software do equipamento e a curva de calibração foi estabelecida pela razão das áreas das absorbâncias:  $A_{1749} / (A_{1749} + A_{1630})$  contra os valores de DE dos padrões, como apresentado na Figura 8.



**Figura 8** - Curva de calibração para determinação do DE por FT-IR

Para a determinação do DE foram selecionadas as frações com teor de ácidos urônicos acima de 20%. Pectinas com grau de esterificação superior a 50% (pectinas HM) e inferior a 50% (pectinas LM) foram encontradas nas frações obtidas da polpa do cupuaçu (Tabela 3). O grau de esterificação variou de 38,8 a 53,1%. Deste modo, verifica-se que todas as frações pécicas obtidas apresentaram DE superior ao das pectinas da casca dos frutos de um cactus (FORNI; PENCI; POLLESELLO, 1994) e a maioria delas são pectinas LM.

**Tabela 3** - Grau de esterificação (DE), determinado por FT-IR, das pectinas obtidas da polpa do cupuaçu.

FRAÇÃO	DE (%)
W-1	53,1
W-2	42,2
HW	39,9
0.1CA	39,4
2.5CA	50,4
5CA	52,4
5CA-2	38,8

Como pode ser verificado na Tabela 2, a glucose está presente como principal monossacarídeo em muitas das frações obtidas da polpa do cupuaçu, em especial nas frações extraídas com ácido cítrico. Isto sugeriu a presença de amido, que foi confirmada pelo teste do lugol, fornecendo uma coloração azul intensa com a solução de  $I_2/KI$ .

O'Donoghue e Somerfield (2007) também obtiveram frações ricas em amido a partir de frutos de um tipo abobrinha (*buttercup squash*) empregando ácido clorídrico e ácido cítrico como agentes extratores visando a obtenção de pectinas, de modo que o teor de amido foi praticamente o dobro do teor de pectinas. De acordo com Zobel e Stephen (1995), certos frutos, cereais, legumes e tubérculos podem conter 30 a 85% de amido em relação ao peso seco.

As hemiceluloses, mais recentemente chamadas glicanas de ligações cruzadas (CARPITA; McCANN, 2000; REDGWELL; MELTON; BRASCH, 1988), foram extraídas pelas soluções alcalinas de NaOH, rendendo frações compostas

principalmente de xilose, manose, galactose e glucose, monossacarídeos típicos das hemiceluloses, sugerindo a presença de xilanas, galactomananas, galactoglucomananas e/ou glucomananas.

O resíduo final é constituído principalmente por glucose, indicando a predominância de celulose.

Além dos dados da composição monossacarídica, análises por HPSEC-MALLS confirmaram que todas as frações polissacarídicas extraídas da polpa do cupuaçu são heterogêneas (dados não mostrados).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO W-1

### 5.2.1 Composição química

A principal fração pectica deste trabalho, denominada W-1, contém 61% de carboidratos e 6% de proteínas. Estes valores são semelhantes àqueles obtidos para as pectinas da polpa da beterraba (YAPO *et al.*, 2007) e do lúpulo (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002).

A carboxi-redução de W-1 indicou que a fração consiste de 65,4 mol% de ácido galacturônico. Teor semelhante de ácidos urônicos foi encontrado para a pectina da casca do maracujá extraída com ácido cítrico a 0,086% (60 min) por Pinheiro (2007), sendo consistente com o predomínio de regiões lisas (*smooth region*).

O grau de esterificação é de 53,1% e o grau de acetilação é de 1,7%, muito menor que os valores obtidos para as pectinas hidrossolúveis das cascas da jaca (5,5%) e do limão Tahiti (6%) (KIOUBALA *et al.*, 2008). O grau de acetilação da fração W-1 é ligeiramente menor que aquele reportado para a pectina LM da casca do maracujá amarelo extraída por água (1,9%) (YAPO; KOFFI, 2006) e ligeiramente maior que o da pectina HM comercial do limão (1,5%) (KRAVTCHENKO; VORAGEN; PILNIK, 1992), sendo que ambas apresentaram um teor superior de ácidos urônicos (76,3 e 72%, respectivamente) em relação à fração W-1.



Dentre os monossacarídeos neutros típicos de pectinas, na fração W-1 houve predomínio da galactose (12,8 mol%), arabinose (5,9 mol%) e ramnose (3,3 mol%). Em adição ao grau de esterificação (53,1%), esses dados sugerem que a estrutura da pectina extraída poderia consistir principalmente de uma homogalacturonana (HG) altamente esterificada e de ramnogalacturonana do tipo I (RG-I) com cadeias laterais de galactanas ou arabinogalactanas. Nas regiões ramificadas das pectinas, uma xilogalacturonana poderia também estar presente. Este tipo de subunidade foi encontrado em grãos de soja (NAKAMURA *et al.*, 2002), em ervilhas (Le GOFF *et al.*, 2001), em pectinas de maçãs (SCHOLS *et al.*, 1995b), e poderia estar presente na fração W-1 do cupuaçu, cujo teor de xilose foi de 3,9 mol%. Entretanto, existe também a possibilidade deste monossacarídeo ser um contaminante devido à co-extração de hemiceluloses.

Schols e Voragen (1996) e Albersheim *et al.* (1996) comentam que as pectinas presentes na porção comestível de frutas e vegetais podem somente consistir de regiões de HG e segmentos como RG-I com seqüências estritamente alternantes de Rha-GalA. Para a pectina solúvel em água extraída da polpa do cupuaçu, esta afirmação parece ser consistente, embora exista a possibilidade de que ela contenha ainda regiões de xilogalacturonanas.

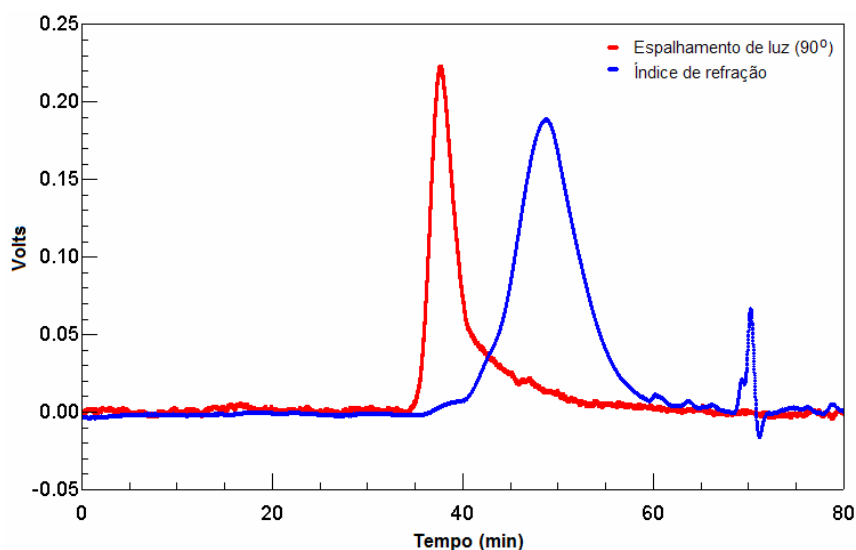
O cálculo da razão da Rha para GalA, deduzido da Tabela 2, sugere que as pectinas da fração W-1 poderiam consistir principalmente de regiões lisas (*smooth region*) ricas em ácido poligalacturônico, tipicamente encontradas em pectinas da lamela média (McCANN; ROBERTS, 1991). Assumindo que as unidades de Rha são parcialmente substituídas, uma razão Rha:GalA alta poderia indicar que as pectinas estão mais altamente ramificadas. Além disso, a razão molar de Rha/(Ara + Gal) é indicativa do grau de ramificação de cadeias laterais, e, neste caso, a fração W-1 parece ser pouco ramificada.

Além dos monossacarídeos característicos de pectinas, a fração W-1 também contém pequenas quantidades de manose, glucose e fucose, que foram então considerados contaminantes. A manose foi encontrada em diferentes proporções em pectinas isoladas de várias fontes (HABIBI *et al.*, 2004; HILZ *et al.*, 2006; IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; KOUBALA *et al.*, 2008; MIYAMOTO; CHANG, 1992; O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2007; OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002; PINHEIRO, 2007; ROS; SCHOLS; VORAGEN, 1998; SCHOLS *et al.*, 1995a; YAPO *et al.*, 2007).

A presença de glucose sugeriu que o amido poderia estar presente numa baixa proporção na fração W-1, o que foi confirmado pelo teste do lugol. O amido foi também encontrado em pectinas isoladas de frutos de um tipo de abobrinha (*buttercup squash*) (O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2007), na pectina da casca do maracujá amarelo (PINHEIRO, 2007), em pectinas do bagaço da maçã (MARCON, 2004; BRINGARD *et al.*, 1990) e na pectina da polpa de manga (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002).

### 5.2.2 Análise por HPSEC-MALLS

A Figura 9 mostra o perfil de eluição da fração W-1 obtido por HPSEC (detector de índice de refração - RI e espalhamento de luz a 90° - MALLS). O índice de refração fornece um sinal proporcional à concentração, enquanto que a resposta do espalhamento de luz depende principalmente da massa molecular.



**Figura 9** - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração W-1

A fração W-1 mostra um perfil heterogêneo, provavelmente oriundo de uma mistura de polissacarídeos pécicos e amido. Observa-se a presença de um pico eluindo em torno de 38 minutos, detectado com muita intensidade pelo espalhamento de luz, que coincide com uma mínima intensidade no índice de refração, indicando que se trata de um componente de elevada massa molecular

presente em uma concentração muito baixa. Este pico poderia ser devido à presença do amido ou ainda resultado de agregação molecular.

Um pico evidente no detector de índice de refração aparece em torno de 50 minutos. Este coincide com uma mínima intensidade no espalhamento de luz, indicando a presença de um polímero com massa molecular menor, em elevada concentração, provavelmente a pectina.

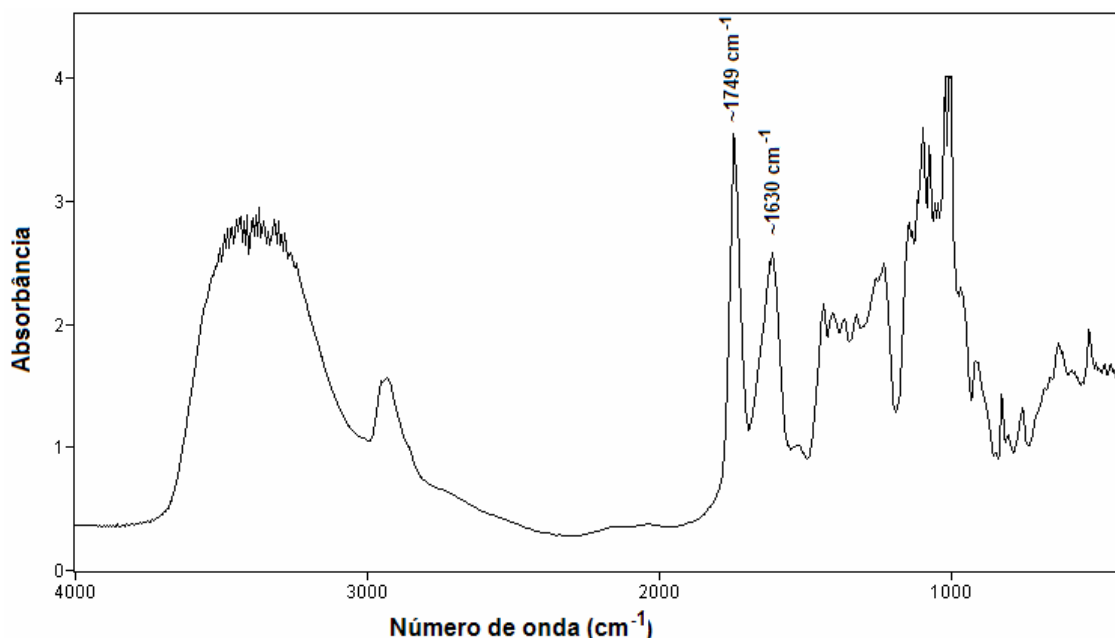
Pinheiro (2007), Santos (2006), Marcon (2004) e Iagher, Reicher e Ganter (2002) também obtiveram frações heterogêneas para pectinas da casca do maracujá amarelo, da polpa do araçá, do bagaço da maçã e da polpa da manga, respectivamente, demonstrando que dificilmente se obtém uma pectina pura a partir de materiais vegetais.

Assim, a determinação da massa molecular exata de uma pectina é uma tarefa extremamente difícil, devido à natureza heterogênea desses polissacarídeos, que apresentam regiões lineares e cadeias laterais ramificadas, variações inter e intramolecular, além de diferentes padrões de distribuição dos grupos metil-éster ao longo da cadeia poligalacturônica (KIM; TENG; WICKER, 2005).

### 5.2.3 Determinação do grau de esterificação e de acetilação

O grau de esterificação da fração W-1 foi determinado por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e por espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN.

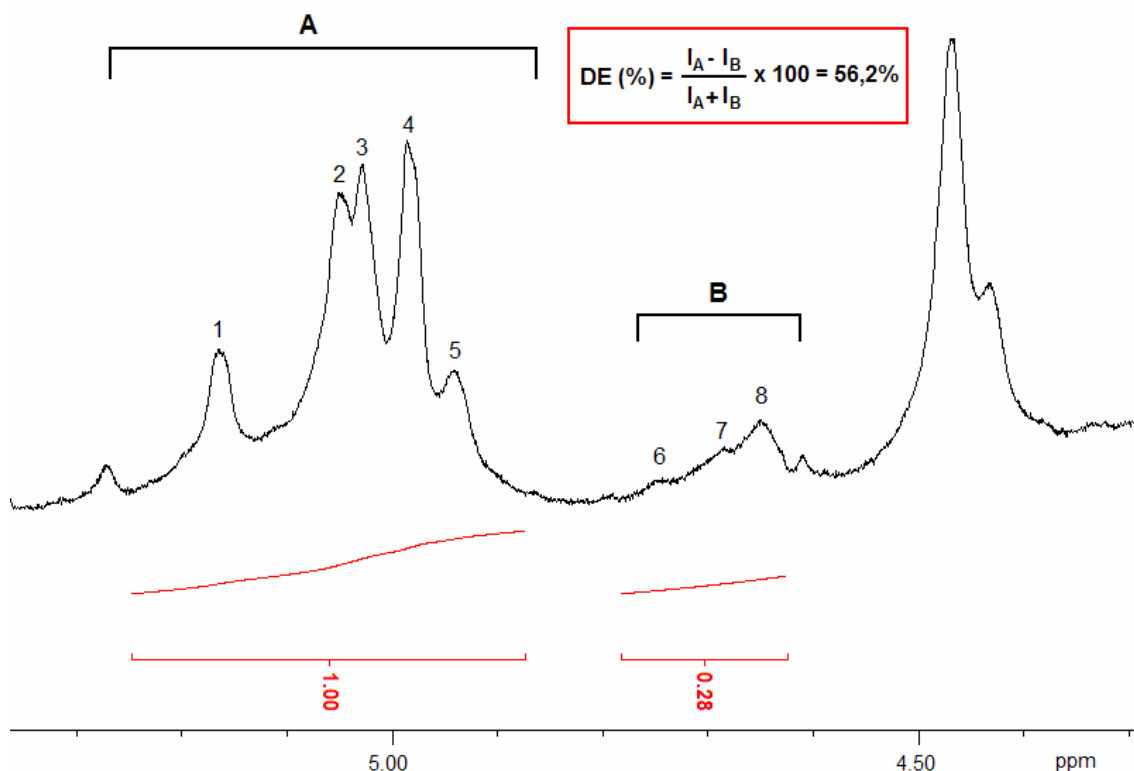
O espectro de FT-IR da fração W-1 é mostrado na Figura 10 e apresenta as bandas características de pectinas esterificadas: entre  $1760\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  oriundas dos grupos carboxílicos esterificados, e bandas um pouco menos intensas entre  $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações dos íons carboxilato. Estas bandas foram utilizadas para determinação do grau de esterificação, que foi de 53,1%, caracterizando uma pectina HM.



**Figura 10** - Espectro de FT-IR da fração W-1

Ainda, as áreas intensas e amplas entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  são causadas pela absorção de O-H devido às pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares da cadeia principal de ácido galacturônico. As bandas por volta de 2950  $\text{cm}^{-1}$  se referem à absorção de C-H, incluindo as vibrações e inclinações de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> (COIMBRA *et al.*, 1998; FILIPPOV, 1992; GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000; KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000).

O grau de esterificação da pectina da fração W-1 foi confirmado por <sup>1</sup>H RMN, de acordo com Grasdalen; Bakøi e Larsen (1988), sendo a análise efetuada em triplicata. A região de campo baixo de um dos espectros obtidos está mostrada na Figura 11. Dentre os cinco sinais observados na região indicada por A (em torno de 4,9-5,2 ppm), os três primeiros (1-3) são atribuídos a H-1 das unidades de ácido galacturônico os outros dois picos (4-5) a H-5, ambos de unidades esterificadas de ácido galacturônico. As áreas relativas das duas ressonâncias H-5 das unidades de ácido galacturônico esterificadas indicam uma distribuição randômica dos grupos éster. O sinal indicado com o número 4 predomina em valores de DE altos e deve ser oriundo de uma unidade esterificada vizinha de outra também esterificada, enquanto que há um predomínio do pico 5 em pectinas com DE baixo, representando H-5 em uma unidade esterificada vizinha de uma não-esterificada.



**Figura 11** - Região de campo baixo do espectro de  $^1\text{H}$  RMN da fração W-1

Quantitativamente, os valores de DE estão relacionados às intensidades ( $I$ ) dos picos em A e B pela seguinte relação:

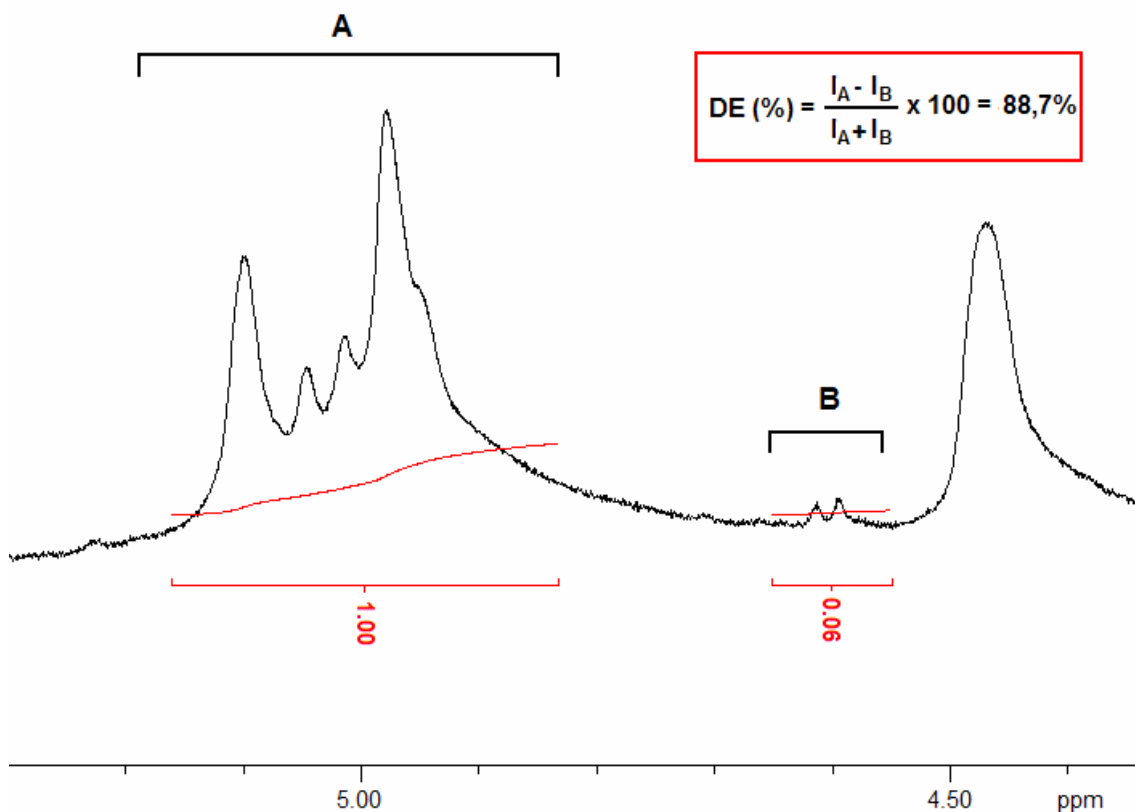
$$\text{DE (\%)} = \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \times 100$$

Onde B denota os três sinais de H-5 de unidades de GalA não-esterificadas e A representa os cinco sinais em campo baixo, incluindo aqueles de H-1 e H-5 das unidades esterificadas. O numerador na equação acima é a soma das intensidades das ressonâncias de H-1 e H-5 em unidades de GalA esterificadas, e o denominador é o total das intensidades destas ressonâncias em unidades esterificadas e não-esterificadas de GalA.

Desta forma, após integração utilizando o software MestreC 4.7, obteve-se o grau de esterificação da fração W-1, cuja média de triplicatas foi de 56%, valor muito próximo àquele encontrado por FT-IR (53,1%).

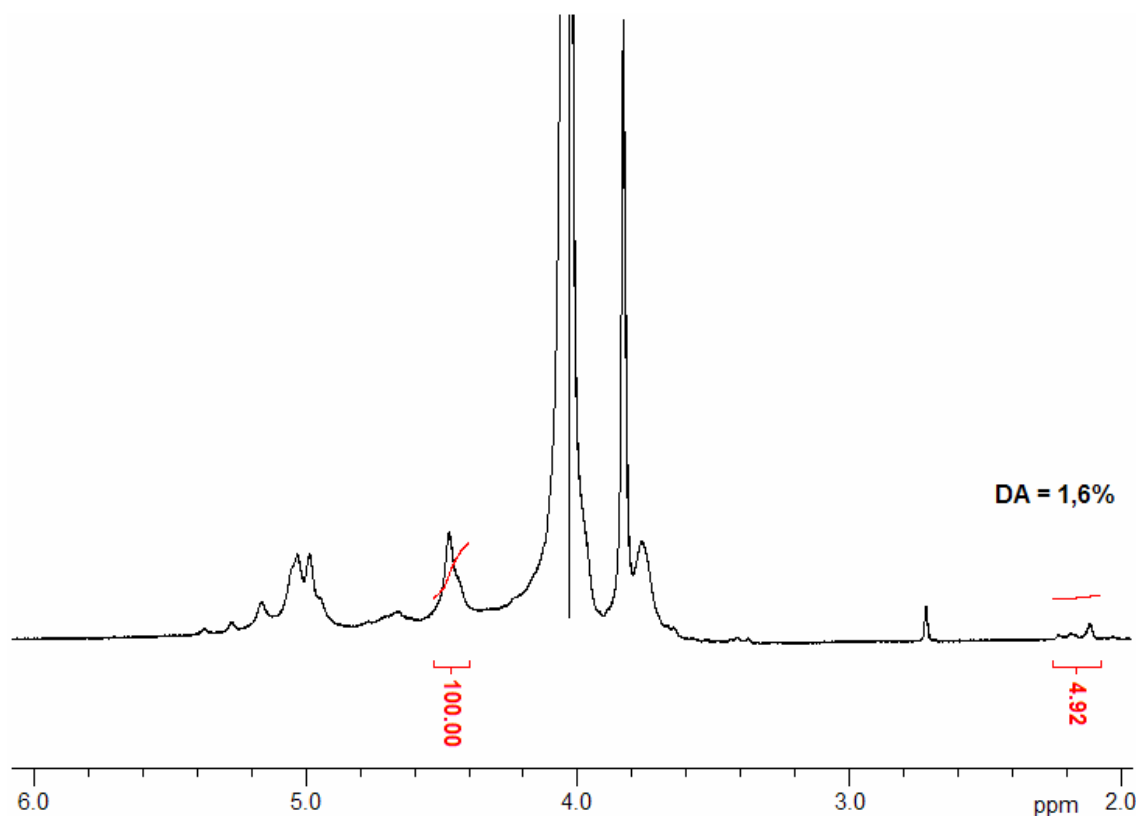
Pode-se dizer que os dois métodos para determinação do grau de esterificação são válidos, uma vez que o método por  $^1\text{H}$  RMN foi testado

inicialmente com o padrão de pectina SIGMA com DE 89% e se obteve um valor de grau de esterificação de 88,7% para o mesmo (Figura 12).



**Figura 12** - Região de campo baixo do espectro de  $^1\text{H}$  RMN do padrão de pectina SIGMA com DE 89%

A determinação do grau de acetilação da pectina da fração W-1 foi realizada baseando-se no método de Bédouet, Courtois e Courtois (2003), também por meio de experimentos de  $^1\text{H}$  RMN. A quantificação foi realizada utilizando-se a ressonância do H-4 do ácido galacturônico, que nos espectros aparece em torno de 4,5 ppm, representando 100% das unidades presentes na amostra. As ressonâncias dos grupos acetílicos em O-2 e/ou O-3 das unidades de ácido galacturônico apareceram como 3 picos entre 2 e 2,2 ppm, que foram integrados utilizando o software MestreC 4.7, resultando num grau de acetilação de 1,7% (média das triplicatas).

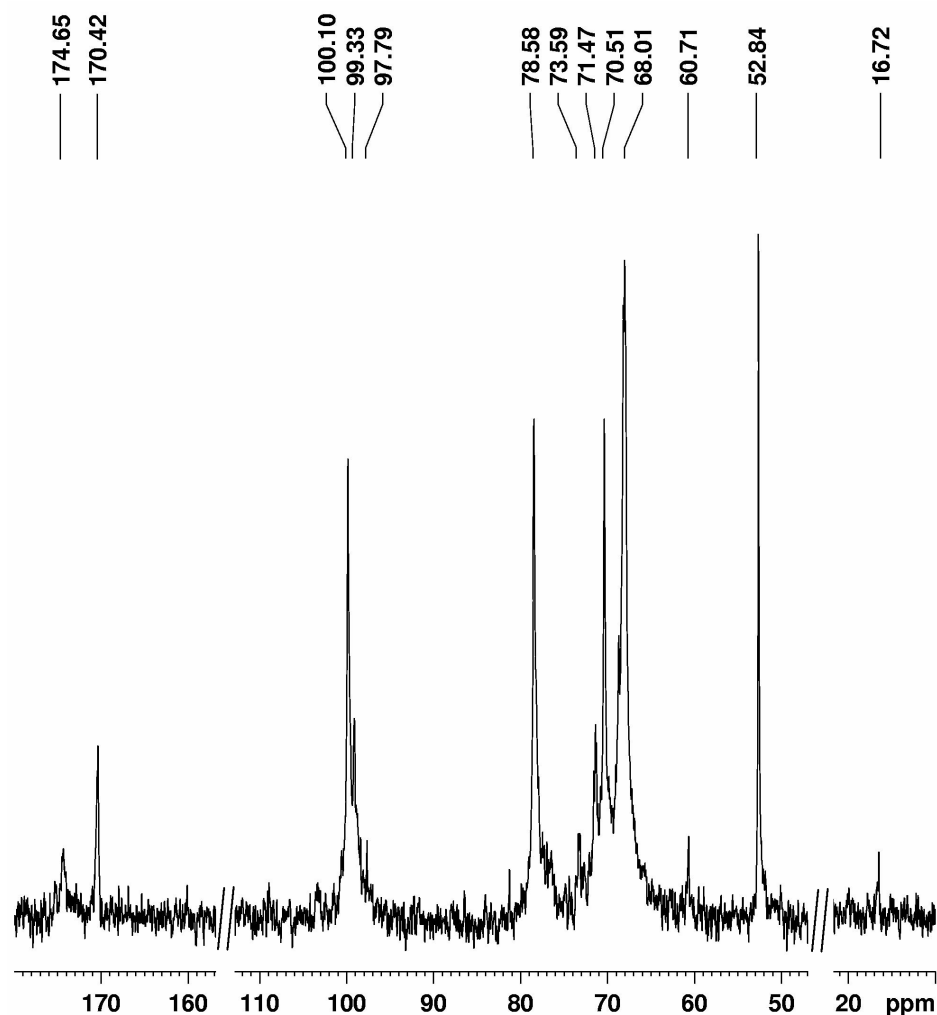


**Figura 13** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN utilizado para uma das determinações do grau de acetilação da fração W-1

O grau de acetilação encontrado foi confirmado por dosagem colorimétrica, de acordo com Hestrin (1949), onde se obteve um valor de 1,6% das unidades de ácido galacturônico acetiladas. O grau de acetilação é um parâmetro importante quando se considera a capacidade de geleificação das pectinas, uma vez que polímeros com DA de 12,5% ou superior não formam géis. Este fator tem sido uma limitação para o aproveitamento das pectinas da polpa de beterraba (ROLIN, 1993; BEMILLER, 1986). Muitos estudos têm sido focalizados na remoção enzimática dos grupamentos acetil de pectinas extraídas da beterraba, resultando em melhora das propriedades geleificantes (FAULDS; WILLIAMSON, 1990; MATTHEW *et al.*, 1990; OOSTERVELD *et al.*, 2000), e, portanto, confirmando que elevado grau de acetilação pode atrapalhar a geleificação de pectinas.

#### 5.2.4 Análise por espectroscopia de $^{13}\text{C}$ -RMN

A fração W-1 foi analisada por espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 14). O ácido  $\alpha$ -D-galacturônico foi evidenciado pelos sinais em 100,1 ppm e 99,3 ppm correspondentes, respectivamente, ao C-1 de unidades esterificadas e não-esterificadas, e dois sinais em campo muito baixo a 170,4 ppm e 174,6 ppm correspondentes aos grupos carboxílicos metil-esterificados e livres, respectivamente. Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos apareceram em 52,8 ppm. Os sinais dos carbonos 2-5 das unidades de ácido galacturônico foram assinalados, respectivamente, em 68,0; 70,5; 78,6 e 71,5 ppm.



**Figura 14** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da fração W-1 em  $\text{D}_2\text{O}$ , obtido a  $70^\circ\text{C}$



O sinal em 97,8 ppm foi atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-ramnose. O sinal de CH<sub>3</sub> das unidades de ramnose foi encontrado em campo alto, em 16,7 ppm. Todos os assinalamentos foram feitos por comparação com a literatura (COZZOLINO *et al.*, 2006; MUKHIDDINOV *et al.*, 2000; TAMAKI *et al.*, 2007; WANG; LIU; FANG, 2005; WESTERENG *et al.*, 2007). Os resultados encontrados são consistentes com a presença de uma homogalacturonana com algumas inserções de RG na fração W-1.

#### 5.2.5 Análises de carboxi-redução e metilação

Para confirmar a identidade das unidades de ácido urônico, a fração W-1 foi submetida ao processo de carboxi-redução. A redução dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos da fração W-1 com NaBD<sub>4</sub> originou a fração RW-1 (reduced W-1).

Após hidrólise e derivatização da fração RW-1, a análise por GLC-MS mostrou um pico principal correspondente ao da galactose, indicando que a fração W-1 é composta de ácido galacturônico, conforme esperado para pectinas.

Após a carboxi-redução, a maioria dos teores de monossacarídeos diminuiu proporcionalmente em relação à fração W-1 nativa, sendo a ramnose uma exceção, cujo teor aumentou, como mostrado na Tabela 4. Isto pode ser explicado pela maior sensibilidade à hidrólise ácida da ligação glicosídica entre Gal-Rha em relação a aquela entre Rha-GalA (BIERMAN, 1989; YAPO *et al.*, 2007).

**Tabela 4** - Comparação entre a composição monossacarídica da fração W-1 nativa e carboxi-reduzida (RW-1)

FRAÇÃO	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	Ác. Urônicos
	mol%							
W-1	3,3	0,6	5,9	3,9	1,0	7,1	12,8	65,4
RW-1	3,9	0,2	1,8	1,7	0,3	3,4	88,7	-

A análise de metilação da fração RW-1 mostrou que as unidades de ácido galacturônico estão unidas por ligações (1→4), pois o principal derivado obtido foi o

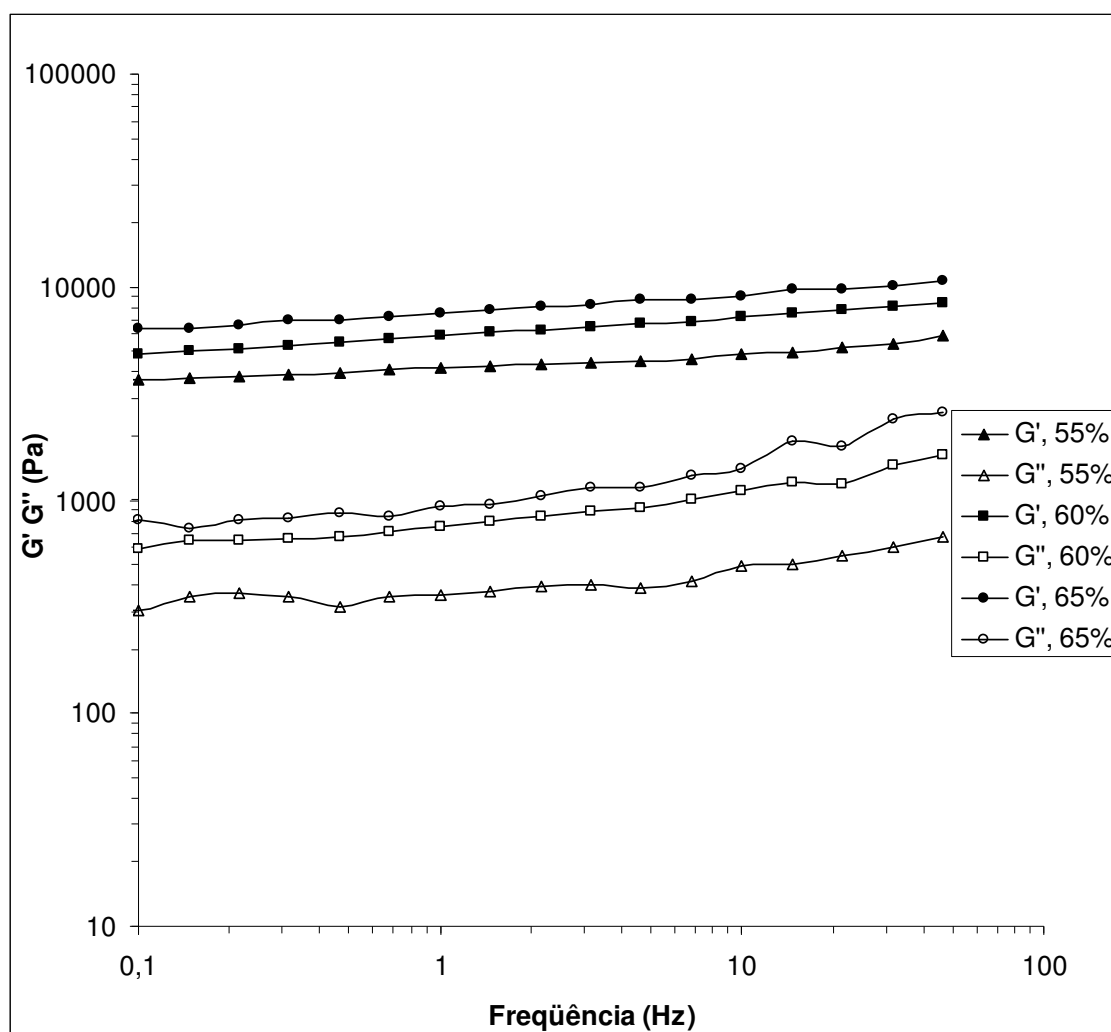
1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil galactitol (78,2%), com uma fragmentação característica a  $m/z$  235, confirmando a natureza pectica da fração W-1. A presença de ramnose ligada (1→2,4) foi evidenciada pela presença do derivado 1,2,4,5-tetra-*O*-acetil-6-deoxi-3-*O*-metil ramnitol (4,1%). Os resultados indicam que a cadeia principal da pectina da fração W-1 é constituída principalmente por uma homogalacturonana com algumas inserções de ramnogalacturonana. Cadeias laterais de monossacarídeos neutros estão ligadas na posição *O*-4 da ramnose, e entre os derivados obtidos encontraram-se alguns daqueles típicos de arabinogalactanas.

#### 5.2.6 Análises reológicas

As medidas reológicas possibilitam a caracterização de pectinas em soluções e géis, permitindo o fornecimento de dados importantes para o desenvolvimento dos processos tecnológicos, para o controle de qualidade das matérias-primas e produtos padronizados, e para a determinação de dados na pesquisa e desenvolvimento de um material específico (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996).

Desta maneira, após a caracterização química, a fração W-1 foi submetida a análises reológicas. Por tratar-se de pectina HM (DE 53,1%), os géis foram preparados em pH 3,0 na presença de sacarose. Embora outros co-solutos possam ser utilizados na produção de géis de pectinas HM, Tsoga, Richardson e Morris (2004) demonstraram que a adição de sacarose produziu melhores resultados com pectinas comerciais de DE 70%. O pH abaixo do pKa do ácido galacturônico reduz a densidade de cargas da cadeia poligalacturônica, diminuindo a repulsão eletrostática e assim facilitando a associação das cadeias por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A sacarose, adicionada em elevadas concentrações a uma solução de pectinas, reduz a atividade da água, favorecendo as interações polímero-polímero em relação às interações polímero-solvente (EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000; LÖFGREN; HERMANSSON, 2007; TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

Inicialmente a fração W-1 foi analisada na concentração fixa de 2% variando-se a concentração de sacarose de 55-65%, em pH 3,0. Após varredura de tensão e seleção da deformação de acordo com a faixa de viscoelasticidade linear, as amostras da fração W-1 a 2% com 55, 60 e 65% de sacarose foram submetidas a testes de varredura de frequência, e suas respostas ao aumento da frequência de oscilação estão representadas na Figura 15. Os valores de deformação utilizados em análises reológicas de polissacarídeos normalmente variam de 1 a 10% (BHATTACHARYA, 1999; CHRONAKIS; KASAPIS; RICHARDSON, 1996; COURRAZE; GROSSIORDI, 1991). As deformações empregadas nas varreduras de frequência deste estudo variaram de 0,12 a 0,7%.



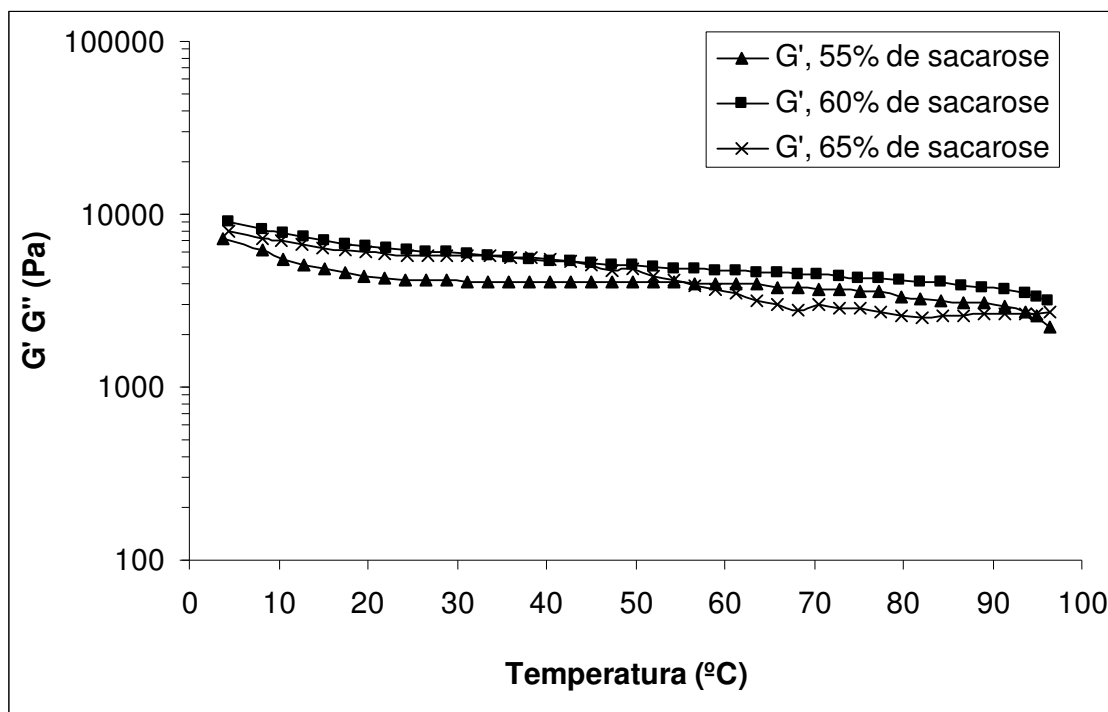
**Figura 15** - Varreduras de frequência a 25°C da fração W-1 a 2% com concentrações de sacarose de 55, 60 e 65% nas deformações de 0,27; 0,7 e 0,12%, respectivamente

A fração W-1 apresentou um predomínio do caráter sólido ( $G' > G''$ ) em todas as concentrações de sacarose utilizadas. Observa-se que os módulos  $G'$  e  $G''$  são independentes por toda a faixa de frequência analisada. Este comportamento reflete a existência de uma rede tridimensional (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996). Verifica-se, também, que  $G'$  é muito maior que  $G''$  em toda a frequência analisada, caracterizando um gel forte (MORRIS, 1995).

O módulo de armazenamento ( $G'$ ) é fortemente afetado pela concentração de sólidos solúveis e, para os géis da fração W-1, seu valor aumenta com o aumento da concentração de sacarose, que promove a redução da atividade da água. O aumento da concentração eficaz de pectina que ocorre pode também contribuir ao aumento de  $G'$  nas amostras (LÖFGREN; HERMANSSON, 2007).

Sharma, Liptay e Le Maguer (1998) verificaram que a força dos géis de pectina HM da polpa de tomates, em pH constante, aumenta com o aumento da concentração de sacarose de 50 para 70%, semelhantemente às observações de BeMiller (1986), provavelmente devido ao aumento do número e do tamanho das zonas de junção formadas durante a geleificação.

As amostras foram submetidas a variações de temperatura, de 5 a 95°C, iniciando com aquecimento, seguido de resfriamento. A Figura 16 está demonstrando uma discreta redução do módulo de armazenamento ( $G'$ ) de todas as amostras durante o aquecimento, sendo os géis mais termoestáveis aqueles contendo 55 e 60% de sacarose.



**Figura 16** - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração W-1 a 2% contendo 55-65% de sacarose na frequência de 1Hz

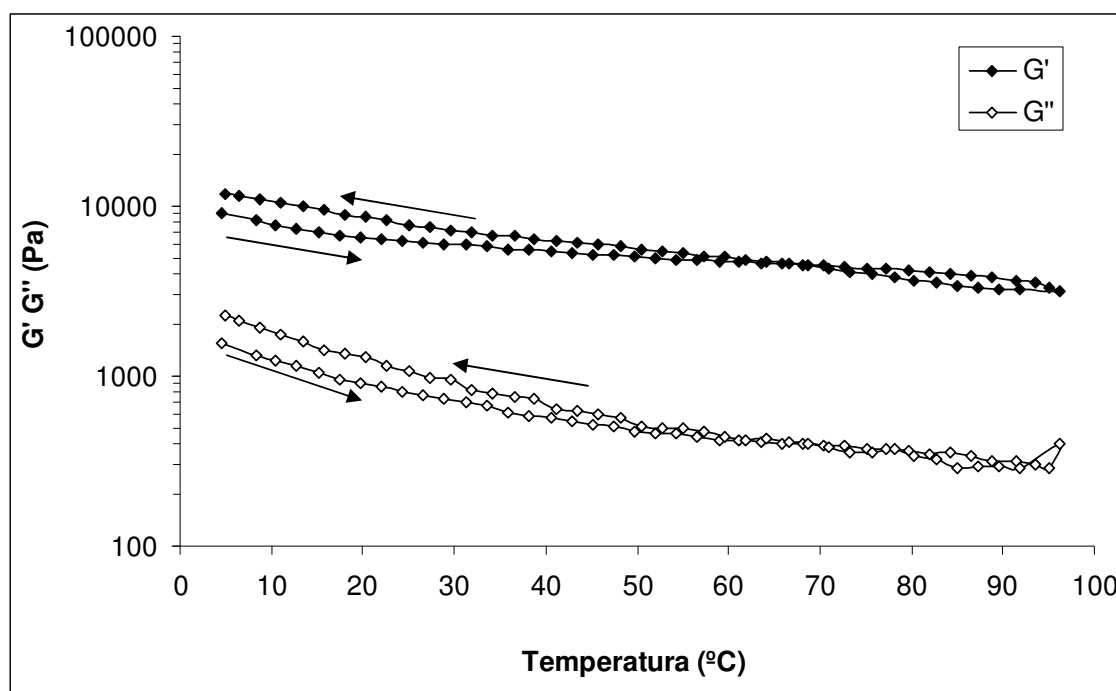
Com o aumento da temperatura, é sabido que as pontes de hidrogênio são enfraquecidas (JOESTEN; SCHAAD, 1974) e as interações hidrofóbicas são fortalecidas (BEN-NAIM, 1980; OAKENFULL; FENWICK, 1977). Em baixas temperaturas, as pontes de hidrogênio são favorecidas, reforçando as zonas de junção e  $G'$  aumenta. Em temperaturas elevadas, a perda da associação por pontes de hidrogênio é compensada com algum reforço das interações hidrofóbicas. Os dois efeitos opostos podem explicar o comportamento apresentado pelos géis com a mudança na temperatura (ALONSO-MOUGÁN *et al.*, 2002; LOPES da SILVA; GONÇALVES; RAO, 1994; OAKENFULL; FENWICK, 1977; OAKENFULL; SCOTT, 1984).

Comportamento diferenciado ao dos géis da fração W-1 foi encontrado, durante o aquecimento de géis de pectinas HM, por Evageliou, Richardson e Morris (2000) para géis contendo sacarose como co-soluto, e por Tsoga, Richardson e Morris (2004) para géis empregando xilitol e outros co-solutos, onde houve uma inicial redução de  $G'$ , mas em maiores temperaturas, o módulo aumentou.

No primeiro caso, o comportamento foi atribuído à formação de uma rede de ácido pectínico termicamente reversível em baixa temperatura, com associações

hidrofóbicas entre os substituintes metil-éster (OAKENFULL, 1991; OAKENFULL; SCOTT, 1984; WALKINSHAW; ARNOTT, 1981) ocasionando o subsequente aumento nos módulos durante o aquecimento e no segundo caso foi atribuído a um aumento no grau de ligações cruzadas das interações hidrofóbicas no decorrer do aquecimento.

O comportamento dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) do gel com 60% de sacarose em um ciclo aquecimento-resfriamento está mostrado na Figura 17.



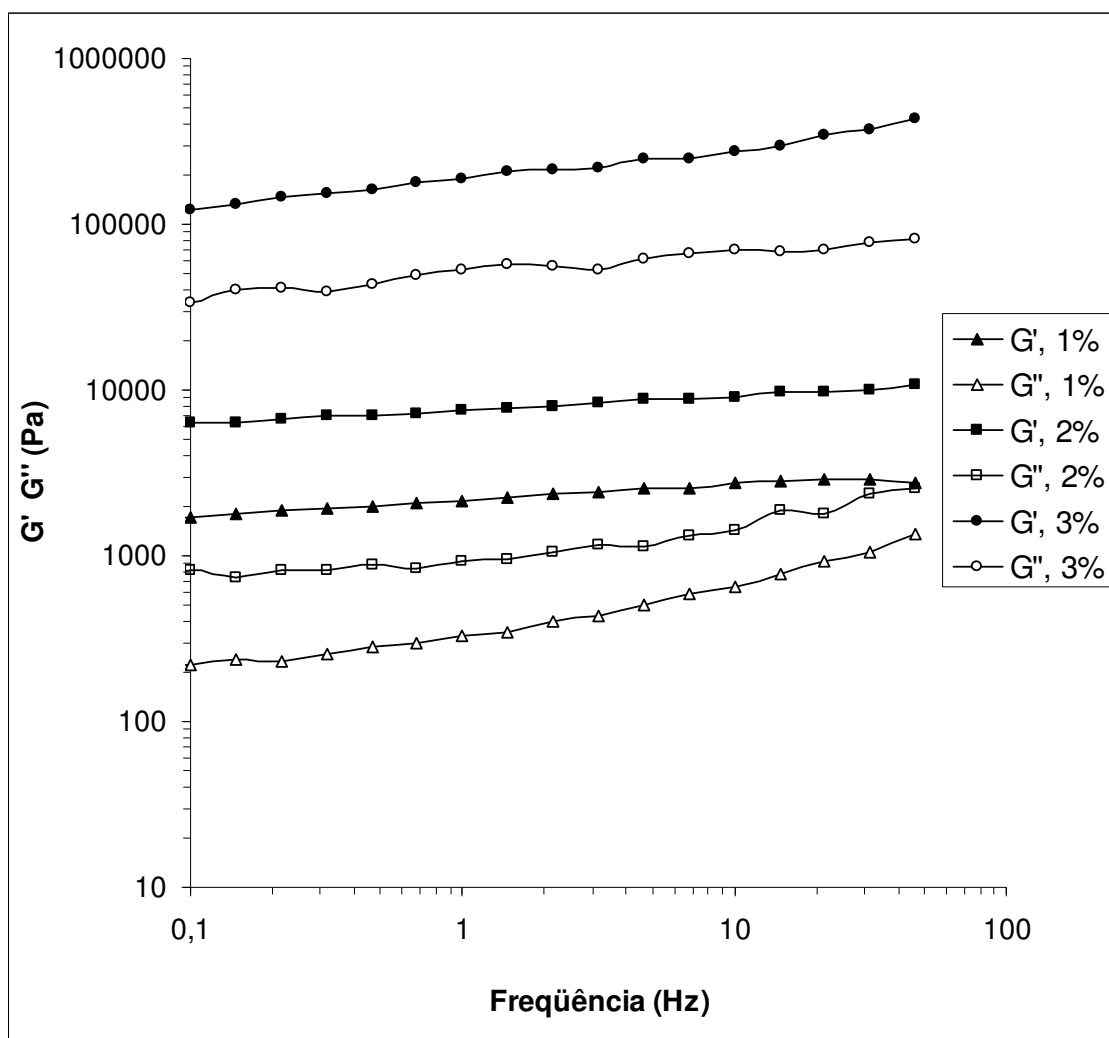
**Figura 17** - Rampa de temperatura do gel da fração W-1 a 2% com 60% de sacarose na frequência de 1Hz

Observa-se que o aquecimento seguido de resfriamento não causa modificações marcantes da textura do gel. Após o aquecimento seguido de resfriamento a 5°C, há um ligeiro aumento dos módulos em relação aos valores iniciais. Um comportamento semelhante foi observado para o gel obtido com 55% de sacarose (dados não mostrados). O gel contendo 65% de sacarose apresentou um comportamento diferenciado com redução acentuada dos valores de  $G'$  ao retornar a 5°C (dados não mostrados).

Os dados obtidos para os géis da fração W-1 com 55 e 60% de sacarose sugerem que a estabilidade térmica total pode ser oriunda da simples preservação e

estabilização das estruturas formadas durante o resfriamento após o preparo do gel, não havendo indicação da formação de novas associações intermoleculares significantes durante o aquecimento (TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

O gel contendo 65% de sacarose foi selecionado para avaliar do efeito da concentração de pectina. Foram preparados géis com a fração W-1 nas concentrações de 1, 2 e 3%, mantendo-se fixos o pH (3,0) e a concentração de sacarose (65%). Os resultados das varreduras de frequência estão representados na Figura 18. As deformações empregadas nas varreduras de frequência deste estudo foram selecionadas dentro da região viscoelástica linear e variaram de 0,04 a 0,4%.



**Figura 18** - Varreduras de frequência a 25°C da fração W-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose nas deformações de 0,4; 0,12 e 0,04%, respectivamente

Todos os géis apresentaram  $G'$  superior a  $G''$  em toda a faixa de frequência analisada, caracterizando géis fortes, com predomínio do caráter sólido, conforme esperado para uma rede tridimensional (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996; MORRIS, 1995).

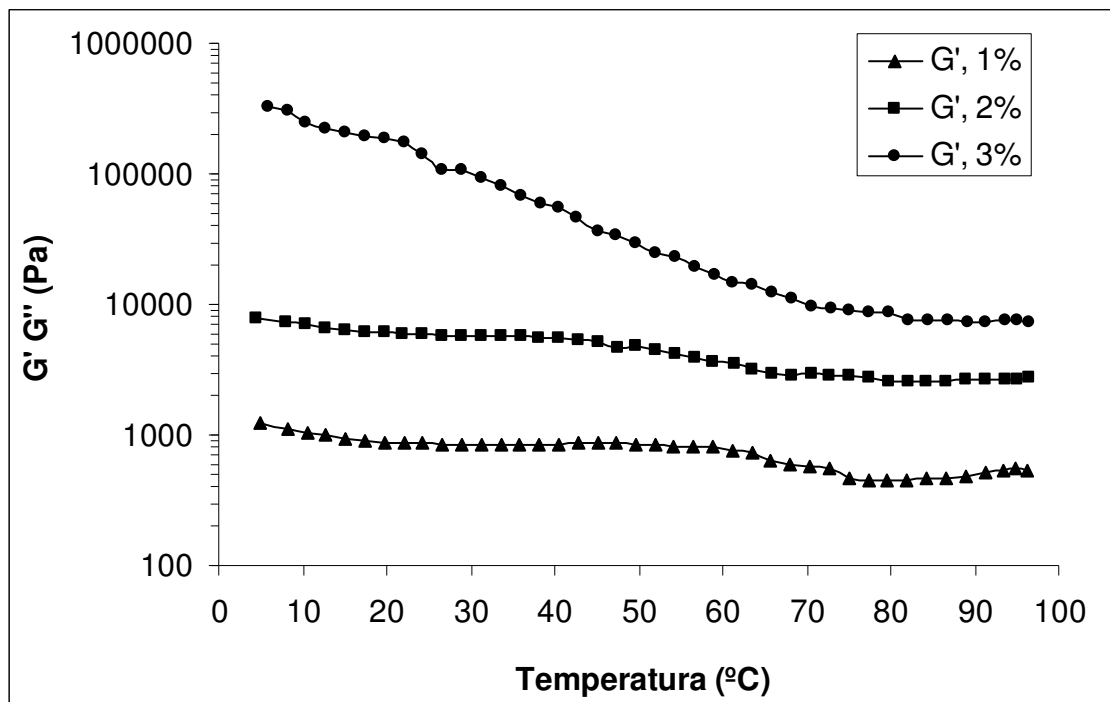
Na menor concentração de pectina (1%) houve pequena dependência de  $G'$  e  $G''$  com o aumento da frequência. Quando a concentração de polissacarídeos é reduzida há um aumento da probabilidade da formação intramolecular de zonas de junção, de modo que não há contribuição para as ligações cruzadas da rede intermolecular (MORRIS, 1995).

A magnitude dos módulos  $G'$  e  $G''$  aumenta com a concentração de pectina, semelhantemente ao comportamento observado com o aumento da concentração de sacarose. Segundo Glicksman (1984), a resistência de géis de pectinas HM é aumentada quando se eleva a concentração do polissacarídeo e também pelo aumento do peso molecular.

Géis obtidos com 3% de pectinas HM isoladas da polpa do araçá vermelho empregando 70% de sacarose (SANTOS, 2006) tiveram seus valores de  $G'$  e  $G''$  inferiores aos obtidos para o gel da fração W-1 na mesma concentração de amostra e com 65% de sacarose. Provavelmente, os fatores responsáveis estão relacionados às propriedades moleculares das duas pectinas, como massa molecular, composição monossacarídica, distribuição dos grupamentos metil-esterificados ao longo da cadeia galacturônica e presença de ramificações na cadeia pectica (AXELOS; THIBAUT, 1991; ROLIN, 1993).

Os géis com concentrações crescentes da fração W-1 (pH 3,0 e 65% de sacarose) foram submetidos a variações de temperatura, de 5 a 95°C, iniciando com aquecimento, seguido de resfriamento. A Figura 19 está demonstrando a variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) de todas as amostras durante o aquecimento.



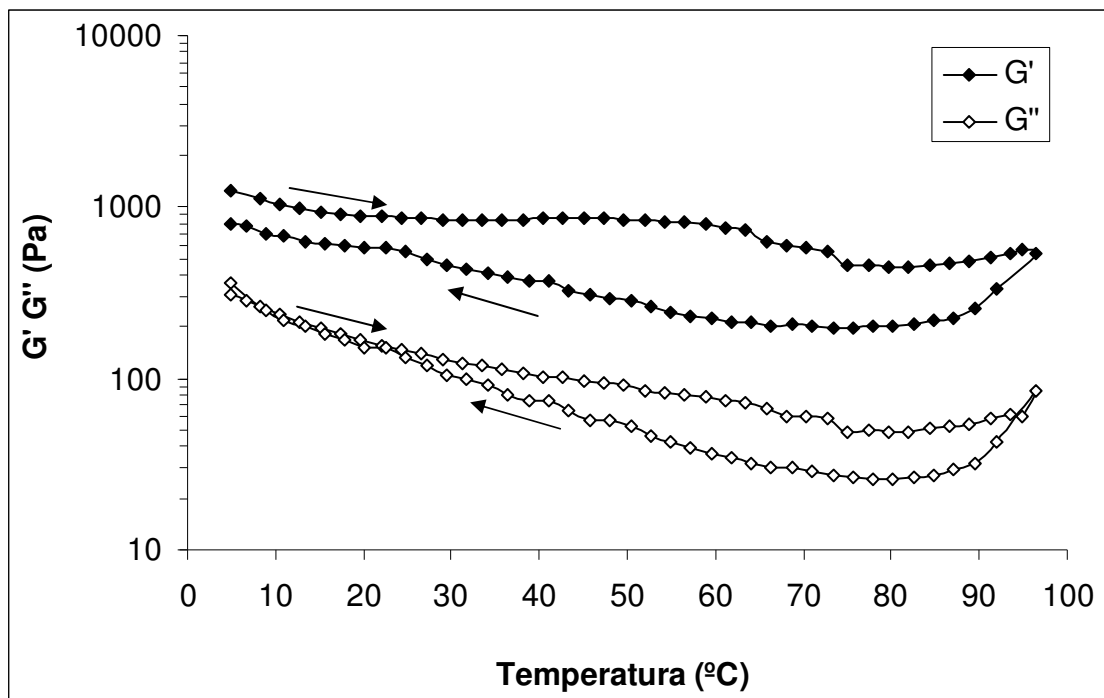


**Figura 19** - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração W-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz

Para as três concentrações da fração W-1,  $G'$  apresentou um decréscimo durante o aquecimento, embora permaneça superior a  $G''$  durante todo o processo, demonstrando o predomínio do caráter sólido dos géis. Os módulos de armazenamento e de perda apresentam uma complexa dependência da temperatura, que pode ser atribuída aos diferentes comportamentos térmicos das forças intermoleculares que estabilizam as ligações cruzadas, não permanentes da rede de gel (LOPES da SILVA; GONÇALVES, 1999).

A amostra contendo 3% da fração W-1 com 65% de sacarose apresentou os maiores valores de  $G'$  e  $G''$ . No entanto, também se caracterizou pelo maior decréscimo nos valores destes módulos durante o aquecimento, e mesmo após o resfriamento e retorno à temperatura inicial (5°C), seus valores ficaram mais de dez vezes inferiores aos iniciais.

O comportamento dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) durante o aquecimento e resfriamento do gel a 1% da fração W-1 com 65% de sacarose está mostrado na Figura 20.



**Figura 20** - Rampa de temperatura do gel da fração W-1 a 1% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz

As amostras a 1, 2 e 3% da fração W-1 apresentaram comportamento semelhante, onde os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) tiveram seus valores reduzidos com o aumento da temperatura, e durante o resfriamento não retornaram aos seus valores iniciais. Este perfil pode ser novamente atribuído pelo enfraquecimento das pontes de hidrogênio (JOESTEN; SCHAAD, 1974) e fortalecimento das interações hidrofóbicas (BEN-NAIM, 1980; OAKENFULL; FENWICK, 1977) durante o aquecimento, mas que ocorreu de uma maneira não totalmente compensatória.

Como a fração W-1 apresentou um grau de esterificação ligeiramente superior a 50%, também se testou sua habilidade de formação de géis na presença de íons cálcio. Inicialmente, as amostras foram preparadas a 1% (p/p) com concentração de cálcio de 0,1% (p/p) na presença de 20% (p/p) de sacarose em pH 3,0. Após aquecimento, resfriamento e repouso sob refrigeração, não se verificou geleificação. Foram efetuados testes aumentando-se o pH, a concentração de cálcio e a concentração de sacarose e também não se evidenciou a formação de géis. Segundo Voragen *et al.* (1995), a afinidade de íons cálcio em relação a pectinas com grupos carboxílicos carregados distribuídos ao acaso sofre modificações em um DE em torno de 50% e acima deste valor, o comportamento das pectinas em relação à

geleificação induzida por cátions é aquele previsto pela teoria. Assim, pectinas HM formarão géis em pH ácido na presença de elevadas concentrações de co-solutos, não necessitando de íons cálcio.

Para avaliar a contribuição do amido, contaminante da fração W-1, no comportamento dos géis, a fração W-1 foi submetida à purificação para remoção do amido e então analisada quanto às suas propriedades reológicas.

### 5.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO W-1, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES REOLÓGICAS DA PECTINA PURIFICADA

#### 5.3.1 Purificação e caracterização

A fração W-1 foi submetida a tratamento enzimático com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase para remoção do amido. Após digestão enzimática, a fração obtida foi denominada PW-1 (purified W-1), com rendimento de 70% em relação à fração W-1.

A fração apresentou 58,3% de carboidratos totais e 5,5% de proteínas. Sua composição monossacarídica está apresentada na Tabela 5 juntamente com aquela da fração W-1 (nativa).

**Tabela 5** - Composição monossacarídica<sup>a</sup> das frações PW-1 e W-1 obtidas da polpa do cupuaçu

FRAÇÃO	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urônicos <sup>b</sup>
	mol%							
PW-1	1,9	-	3,9	0,8	0,9	9,8	0,8	81,9
W-1	3,3	0,6	5,9	3,9	1,0	12,8	7,1	65,4

a: determinada por glc, mol%.

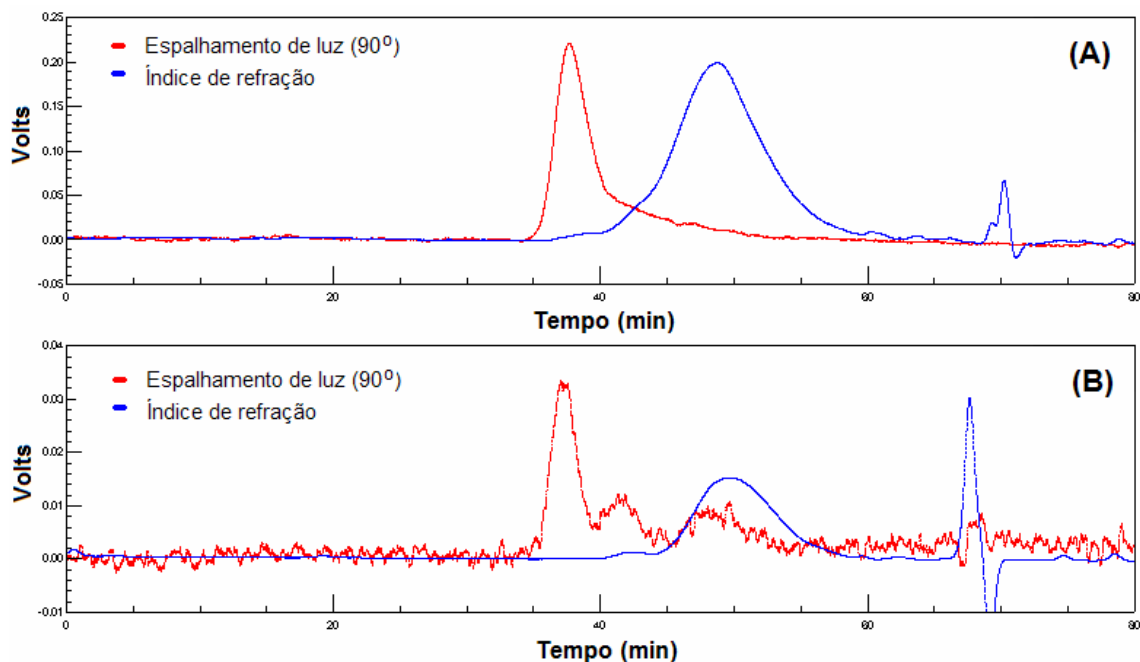
b: determinado por método colorimétrico, Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991.

Nota-se que a fração PW-1 é constituída majoritariamente por ácidos urônicos (81,9%), valor superior ao encontrado por Koubala *et al.* (2008) para pectinas solúveis em água da casca de cajá (72,7%) e para pectinas solúveis em água do limão Tahiti (49,3%).

Após o tratamento enzimático, houve redução dos teores relativos dos outros monossacarídeos. Pode-se verificar que restou apenas um teor residual de Glc, indicando que a maioria do amido presente na fração foi removida. O'Donoghue e Somerfield (2007) trataram extratos contendo pectinas e amido com amilase, amiloglicosidase e pululanase e também restou um teor residual de amido nas pectinas isoladas de um tipo de abobrinha.

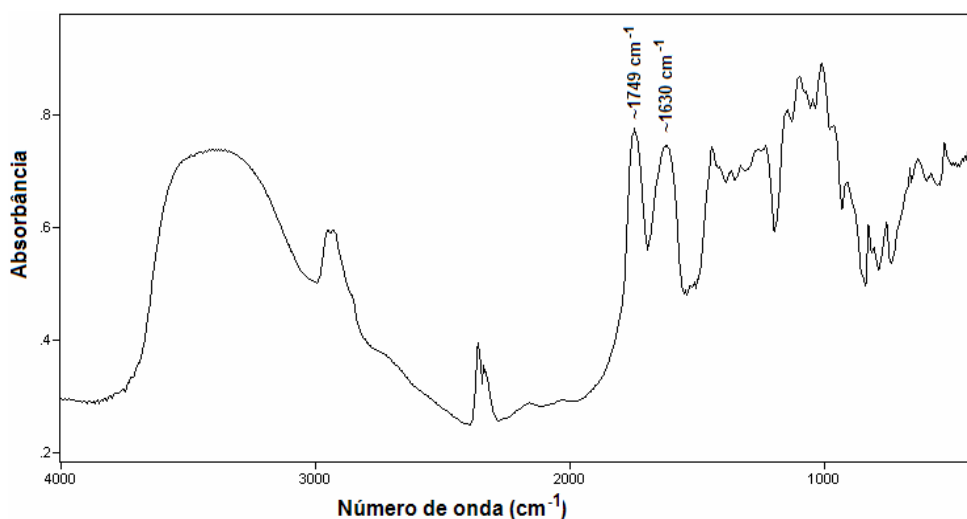
A redução dos teores dos outros monossacarídeos pode ser devido ao processamento efetuado durante a purificação, levando à perda de cadeias laterais. Procedimentos que envolvem aquecimento de soluções de pectinas a elevadas temperaturas podem levar à despolimerização, hidrólise das ligações glicosídicas e desesterificação (GLICKSMAN, 1984).

Apesar da remoção do amido, o perfil de eluição da fração PW-1 por HPSEC-MALLS revelou que a amostra não apresentou homogeneidade, conforme mostrado na Figura 21. Ao se comparar os perfis da fração W-1 antes e depois do tratamento enzimático, na fração nativa percebe-se que o composto que elui em torno de 38 minutos, detectado em grande intensidade pelo espalhamento de luz e em pouca intensidade pelo índice de refração, praticamente desaparece após o tratamento com as enzimas, sendo somente visível pelo espalhamento de luz, sugerindo tratar-se do amido.



**Figura 21** - Perfis de eluição por HPSEC-MALLS das frações W-1 nativa (A) e PW-1 (após tratamento com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase) (B)

O espectro de FT-IR obtido para a fração PW-1 está mostrado na Figura 22, e o DE determinado para o polissacarídeo foi de 51,3%, levemente inferior ao valor da fração W-1, embora ainda seja caracterizada como uma pectina HM.



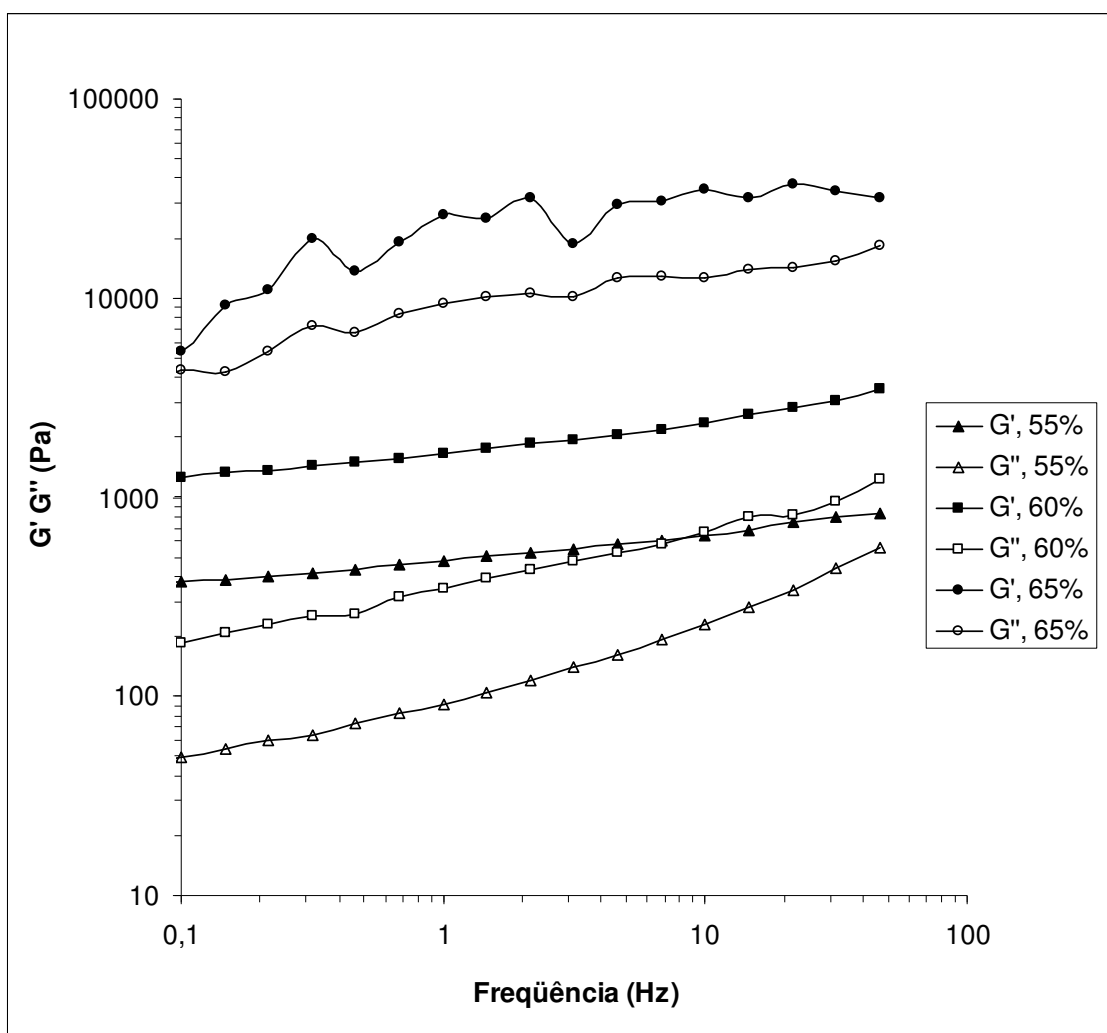
**Figura 22** - Espectro de FT-IR da fração PW-1

O polissacarídeo purificado também foi analisado por espectroscopia de <sup>13</sup>C RMN, sendo os sinais obtidos semelhantes à fração original, W-1 (dados não mostrados).

### 5.3.2 Análises reológicas da fração PW-1

A fração PW-1, correspondente à fração pectica W-1 livre de amido, foi analisada reologicamente nas mesmas condições da fração W-1.

As varreduras de frequência da pectina purificada, PW-1, a 2% com diferentes concentrações de sacarose estão mostradas na Figura 23. As deformações empregadas nestes experimentos variaram de 0,3 a 4,0%.



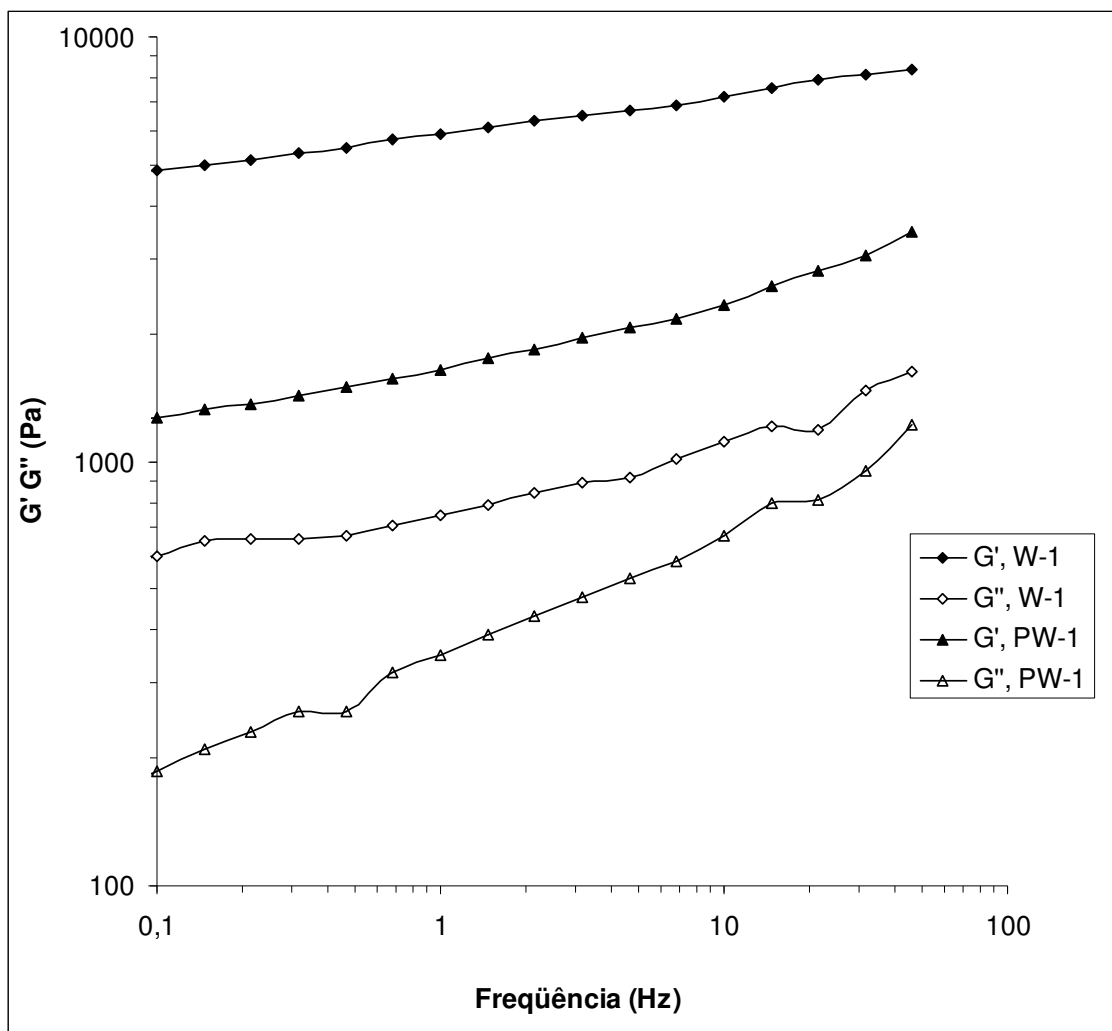
**Figura 23** - Varreduras de frequência a 25°C da fração PW-1 a 2% com concentrações de sacarose de 55, 60 e 65% nas deformações de 4,0; 0,4 e 0,3%, respectivamente

A magnitude do módulo de armazenamento ( $G'$ ) dos géis da fração PW-1 aumenta com o aumento da concentração de sacarose, semelhantemente à fração

W-1. É possível verificar o predomínio do caráter sólido na presença de todas as concentrações de sacarose ( $G' > G''$ ).

Na presença de menores concentrações de sacarose (55%) há uma maior dependência de  $G'$  e  $G''$  em relação à frequência de oscilação, especialmente no módulo  $G''$ .

Ao se comparar os géis da fração PW-1 com os da fração W-1, nas mesmas condições de análise, percebe-se que os géis da fração PW-1 apresentam valores menores de  $G'$  e  $G''$  e são mais sensíveis às variações da frequência de deformação, indicando uma maior fragilidade da estrutura, conforme demonstrado na Figura 24 para os géis com 60% de sacarose e 2% da fração.



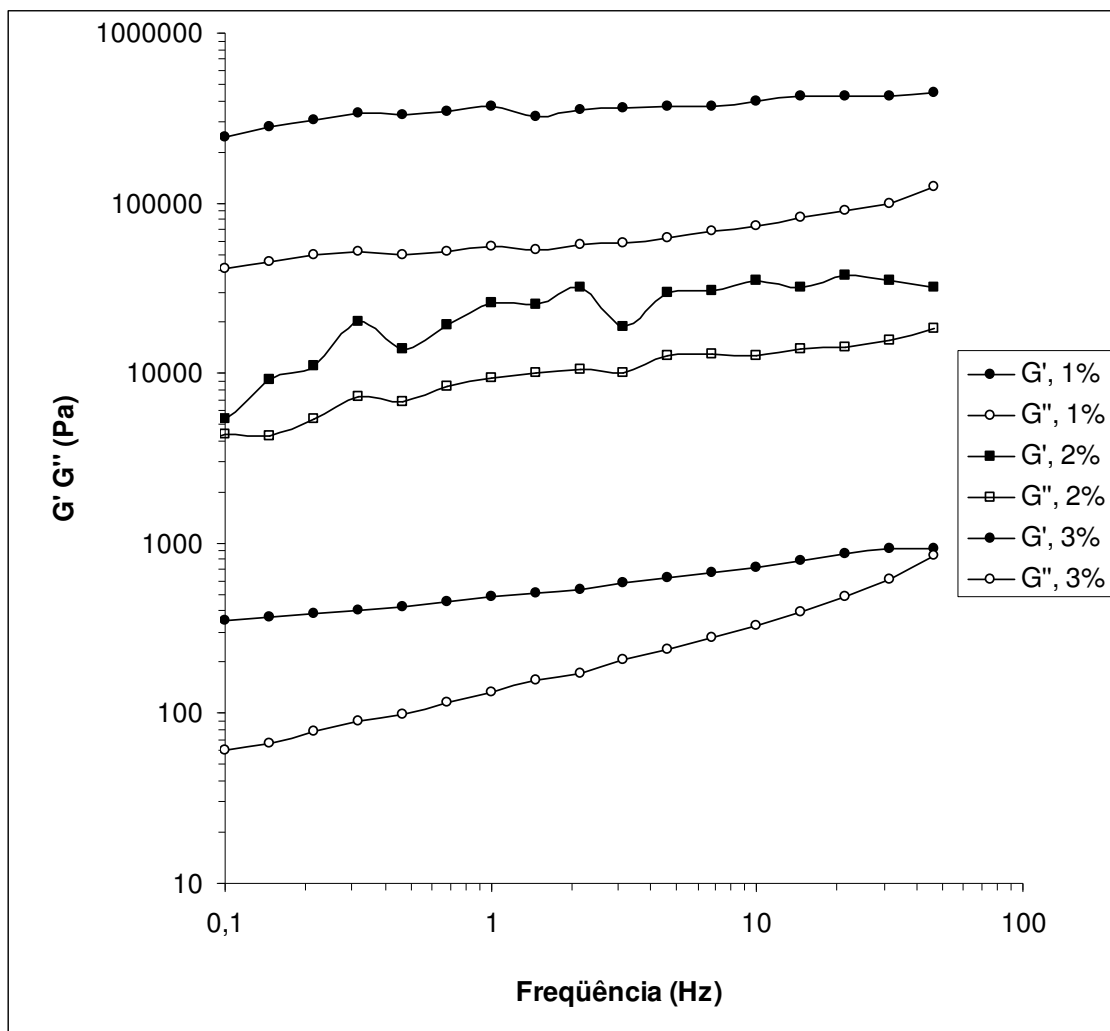
**Figura 24** - Varreduras de frequência a 25°C das frações W-1 e PW-1 a 2% com 60% de sacarose nas deformações de 0,7 e 0,4%, respectivamente

As amostras de géis da fração PW-1 a 2% (pH 3,0) com diferentes concentrações de sacarose foram submetidas a variações de temperatura, de 5 a 95°C, iniciando com aquecimento, seguido de resfriamento (dados não mostrados). Pôde-se perceber que os géis obtidos com a fração PW-1 são mais sensíveis a mudanças de temperatura que aqueles obtidos com a fração W-1. Para os géis com 55 e 60% de sacarose, após o resfriamento e retorno à temperatura de 5°C, obteve-se um valor superior de ambos os módulos em relação ao valor inicial. Já para o gel da fração PW-1 a 2% com 65% de sacarose, após o resfriamento,  $G'$  e  $G''$  não retornaram aos valores iniciais.

Tsoga, Richardson e Morris (2004) observaram que no resfriamento até 5°C após o aquecimento de seus géis de pectina HM, houve um aumento adicional de  $G'$  e  $G''$ , semelhante aos resultados obtidos por Evageliou, Richardson e Morris (2000). Isto foi atribuído a uma progressiva segregação, durante o ciclo térmico, de seqüências com um teor de éster menor do que a média total para a amostra de pectina, causando junções de ácido pectínico mais estáveis, e de seqüências de teor de éster maior que a média, realçando as interações hidrofóbicas.

A fração PW-1 foi analisada nas concentrações de 1, 2 e 3% com 65% de sacarose. As varreduras de freqüência estão representadas na Figura 25. As deformações empregadas nos experimentos variaram de 0,22 a 2%.





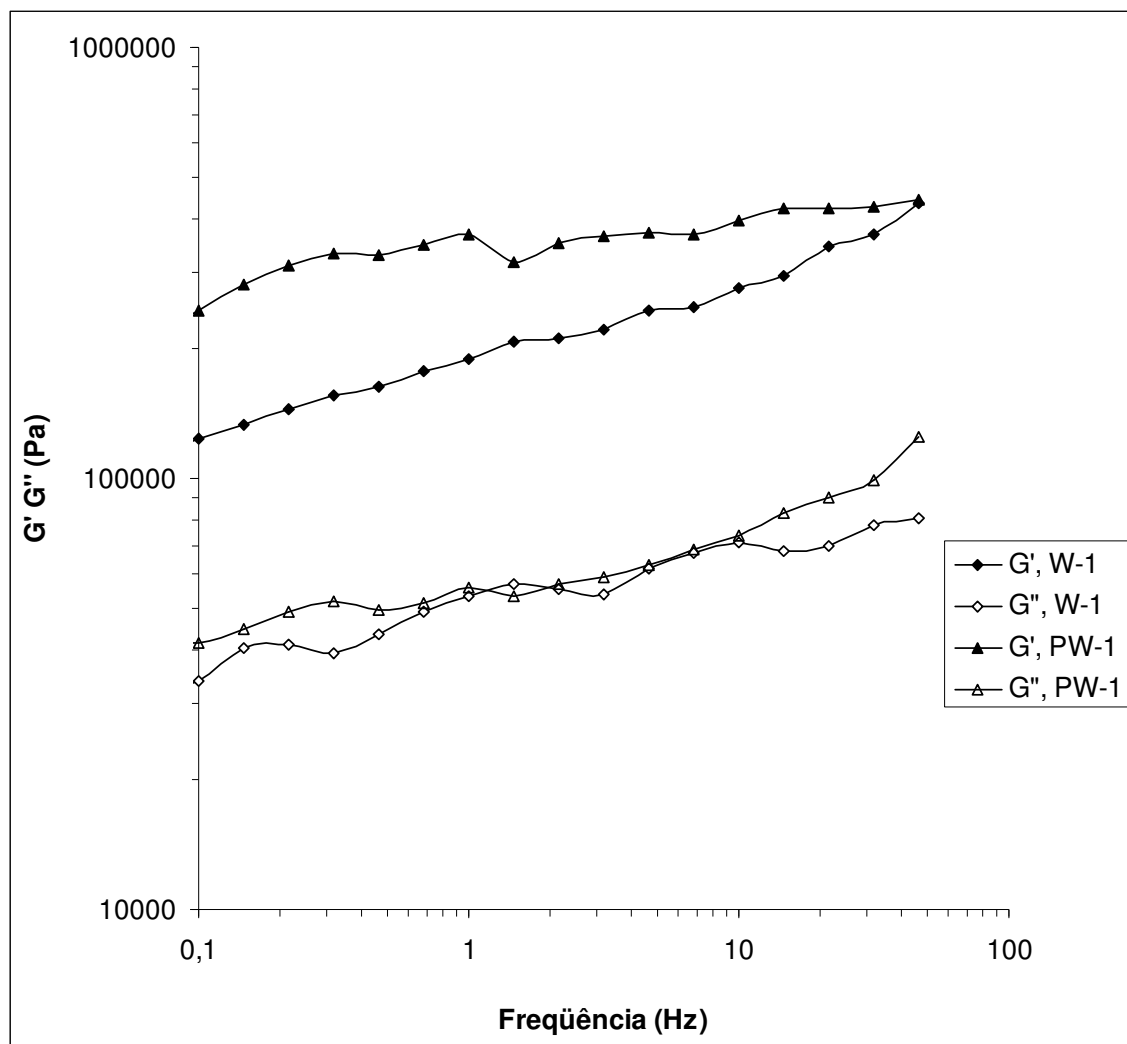
**Figura 25** - Varreduras de frequência a 25°C da fração PW-1 a 1, 2 e 3% com 65% de sacarose nas deformações de 2,0; 0,3 e 0,22%, respectivamente

Em todas as concentrações houve predomínio do módulo elástico,  $G'$  sobre o módulo viscoso,  $G''$  por toda a faixa de frequência analisada, como esperado para um gel (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996; MORRIS, 1995). Em concentrações menores da PW-1 há uma maior dependência dos módulos  $G'$  e  $G''$  em relação à frequência, sendo que  $G''$  é mais dependente da frequência. O efeito observado é mais pronunciado do que para a fração W-1.

A magnitude dos módulos  $G'$  e  $G''$  aumenta com a concentração de pectina, semelhantemente ao comportamento observado com o aumento da concentração de sacarose.

O gel a 3% da fração PW-1 apresentou uma força superior àquela semelhante obtido da fração W-1, com uma maior magnitude e diferença entre os

valores de  $G'$  e  $G''$  (Figura 26), especialmente em frequências mais baixas. Este comportamento, observado somente para esta concentração de pectina, poderia ser atribuído a uma melhor solubilização do polissacarídeo da fração PW-1 nesta concentração, evidenciada visualmente durante o preparo dos géis.

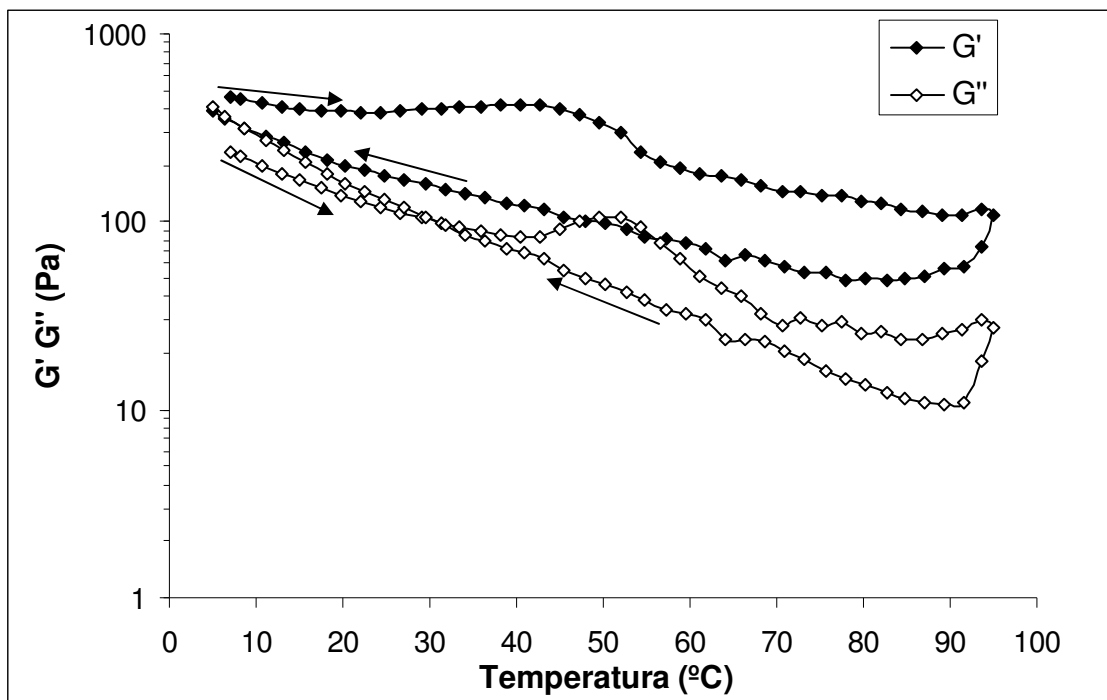


**Figura 26** - Varreduras de frequência a 25°C das frações W-1 e PW-1 a 3% com 65% de sacarose nas deformações de 0,04 e 0,22%, respectivamente

Com 2% da fração PW-1, a diferença entre os módulos  $G'$  e  $G''$  foi menor do que aquela obtida para o gel semelhante da fração W-1, embora a magnitude dos seus valores seja superior. No gel a 1% de PW-1, tanto o valor dos módulos quanto a diferença entre eles foram inferiores àquelas da fração W-1.

As amostras também foram submetidas a variações de temperatura, de 5 a 95°C, iniciando com aquecimento, seguido de resfriamento. O perfil obtido para a

amostra na concentração de 1% está mostrado na Figura 27. As demais amostras apresentaram comportamento semelhante, onde os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) tiveram seus valores reduzidos com o aumento da temperatura, e durante o resfriamento  $G'$  não retornou aos seus valores iniciais.



**Figura 27** - Rampa de temperatura do gel da fração PW-1 a 1% com 65% de sacarose na frequência de 1Hz

Um comportamento parecido foi observado por Tsoga, Richardson e Morris (2004) para o gel a 1% de pectina HM empregando 60% ou mais de xilitol, sorbitol, glucose ou sacarose, como co-solutos. Segundo estes autores, a redução nos módulos, observada em elevada temperatura durante o aquecimento de géis de pectinas formados com alta concentração de co-solutos sólidos, indica que as associações hidrofóbicas podem também causar uma depleção da força do gel. Uma provável interpretação é que a redução dos módulos (e força do gel) vem de uma associação excessiva, levando à formação de grandes agregados empacotados de cadeias de pectinas unidas por interações hidrofóbicas que não contribuem significativamente para a rede do gel.

Por todos os resultados apresentados, pode-se sugerir que o amido apresenta efeito sinérgico na formação dos géis da pectina obtida da polpa do cupuaçu, principalmente em fatores relacionados à termoestabilidade. O amido

poderia estar auxiliando na formação e estabilização das interações entre as moléculas de pectina. É possível que a presença do amido estabilize determinadas conformações das cadeias de pectinas que sejam mais propícias ao estabelecimento de interações intermoleculares.

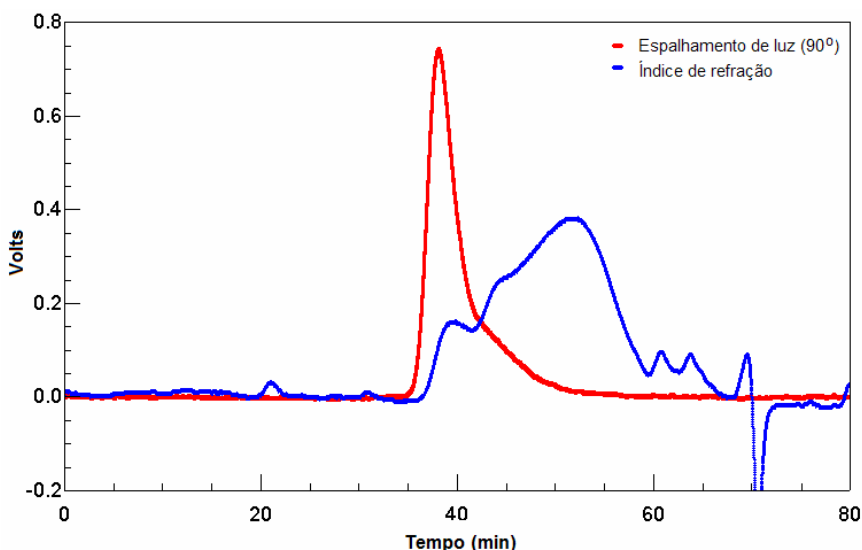
#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO 0.1CA-2

##### 5.4.1 Composição química

A fração 0.1CA-2, obtida por extração com ácido cítrico a 0,1% em banho-maria fervente por 60 minutos, foi a principal fração obtida da polpa do cupuaçu, em termos quantitativos, com 15% de rendimento em relação ao material de partida seco e deslipidificado. Conforme está demonstrado na Tabela 2, esta fração é constituída por 91% de glucose, sugerindo a presença majoritária de amido, que foi confirmada pelo teste do lugol. O teor de carboidratos totais (Tabela 1) foi de aproximadamente 91%, valor muito próximo aos encontrados por Freitas *et al.* (2004) para amidos do cará (*Dioscorea alata*) (88%) e da mandioca (*Manihot utilíssima*) (87,4%). Monossacarídeos típicos de pectinas também estão presentes em quantidades reduzidas (Tabela 2).

##### 5.4.2 Análise por HPSEC-MALLS

A Figura 28 mostra o perfil de eluição da fração 0.1CA-2, obtido por HPSEC-MALLS. Em adição aos dados de composição monossacarídica, verifica-se que a fração apresenta um perfil heterogêneo, oriundo possivelmente da mistura de amido com pectinas.

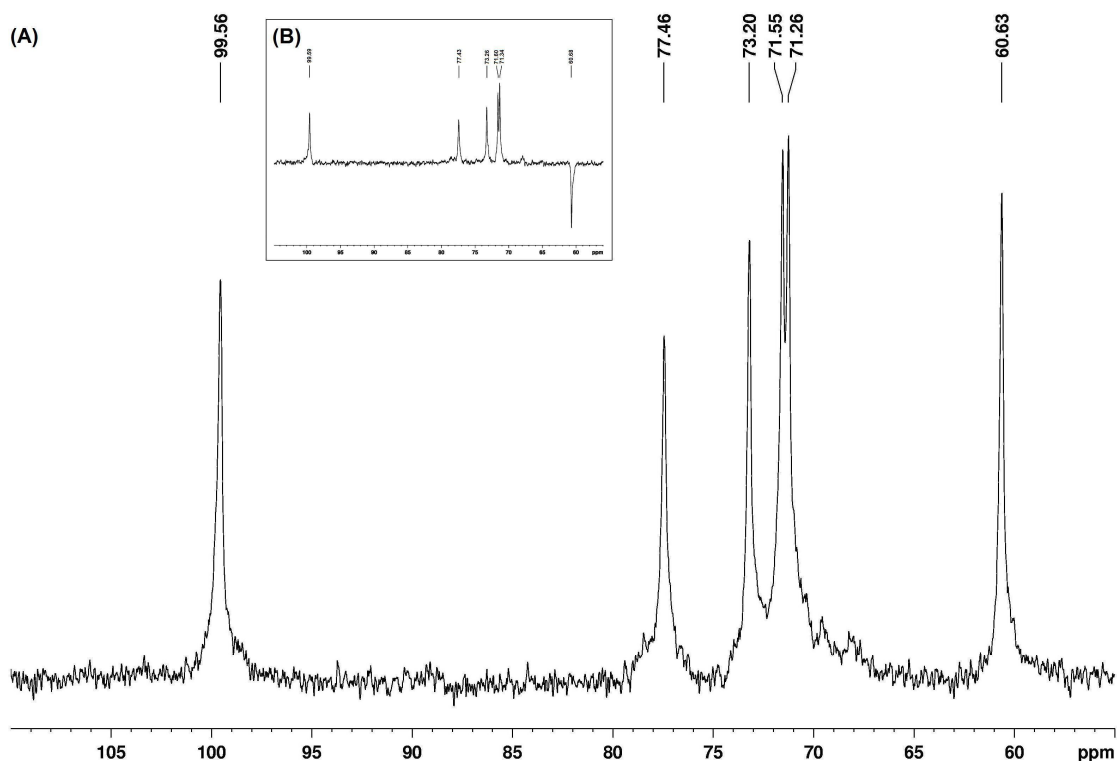


**Figura 28** - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração 0.1CA-2

Observa-se a presença de um pico principal eluindo em torno de 38 minutos, detectado com muita intensidade pelo espalhamento de luz, e cuja porção final apresenta outro pico sobreposto. Já pelo detector de índice de refração é possível verificar a presença de várias moléculas de diferentes massas moleculares e em distintas concentrações, provavelmente devido às pectinas presentes na fração e ao amido, que é um polissacarídeo polimolecular e polidisperso.

#### 5.4.3 Análise por espectrometria de $^{13}\text{C}$ -RMN

A fração 0.1CA-2 foi analisada por espectrometria de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 29(A)). O espectro é semelhante ao apresentado por Freitas (2003) para uma amostra de amido de milho com alto teor de amilose, indicando que a fração é constituída predominantemente por este tipo de molécula. Na região anomérica observa-se a presença de um sinal em 99,5 ppm, referente ao C-1 de unidades piranosídicas de  $\alpha$ -D-glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4). O sinal em 60,6 ppm refere-se ao C-6 livre dessas unidades, confirmado por experimentos de dept-135, onde houve inversão deste sinal (Inserção (B) na Figura 29). Em 77,4 ppm aparece o sinal referente ao C-4 de unidades de  $\alpha$ -D-Glcp não-substituídas. Os deslocamentos em 73,2; 71,5 e 71,2 ppm referem-se, respectivamente, aos carbonos 3, 2 e 5 de unidades de  $\alpha$ -D-Glcp.

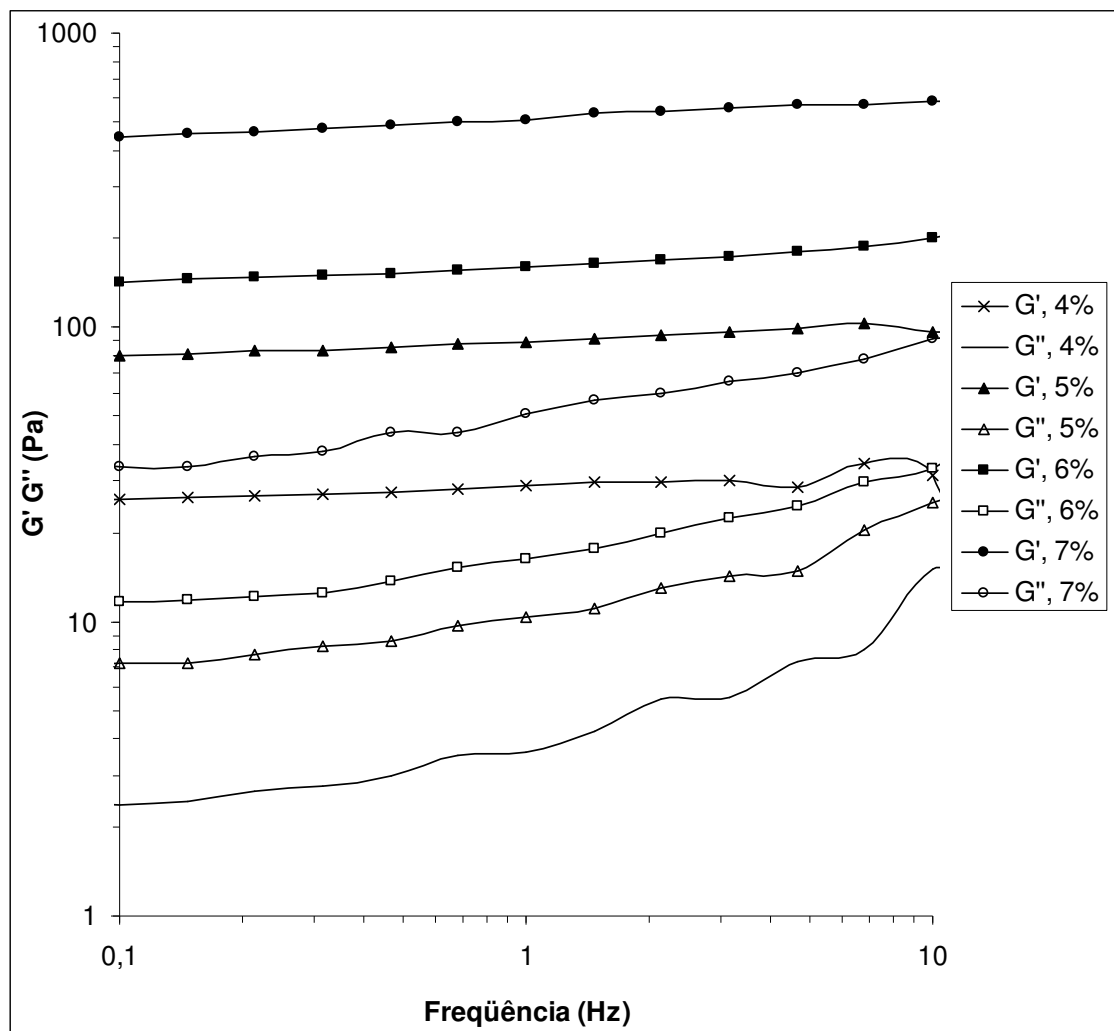


**Figura 29** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $70^\circ\text{C}$ , (A) fração 0.1CA-2; (B) dept-135 da fração 0.1CA-2

#### 5.4.4 Análises reológicas

Por ser a fração de maior rendimento obtida a partir da polpa do cupuaçu e por ser constituída principalmente por amido, um biopolímero amplamente empregado na indústria alimentícia (WHISTLER; BeMILLER, 1997), a fração 0.1CA-2 foi analisada reologicamente. Os géis foram preparados em concentrações de 4 a 7% de polímero.

As varreduras de frequência para a fração rica em amido, nas concentrações de 4 a 7% estão demonstradas na Figura 30. As análises foram efetuadas dentro do limite da viscoelasticidade linear com tensões variando de 1 a 4 Pa.



**Figura 30** - Varreduras de frequência a 25°C da fração 0.1CA-2 a 4, 5, 6 e 7% nas tensões de 1,5; 4,0; 1,0 e 3,0 Pa, respectivamente

Os módulos elásticos ( $G'$ ) foram relativamente independentes da frequência, enquanto que os módulos viscosos ( $G''$ ) são levemente dependentes da frequência. Há um gradual aumento de  $G''$  com a frequência em todas as concentrações da fração 0.1CA-2.

Resultados semelhantes foram obtidos por Rosalina e Bhattacharya (2002) para amidos de milho nativos e modificados, e por Khondkar *et al.* (2007) para alguns géis de amido de milho (*waxy*) ligados e não-ligados a pectinas LM.

O resultado das análises oscilatórias dinâmicas para as amostras da fração 0.1CA-2 mostrou que o módulo de armazenamento ( $G'$ ) apresentou-se muito superior ao módulo de perda ( $G''$ ) em toda a faixa de frequência analisada, caracterizando a presença de uma estrutura em rede ou gel forte (CLARK; ROSS-

MURPHY, 1987; MORRIS, 1995). A magnitude do módulo de armazenamento e de perda aumentou com o aumento da concentração da fração 0.1CA-2.

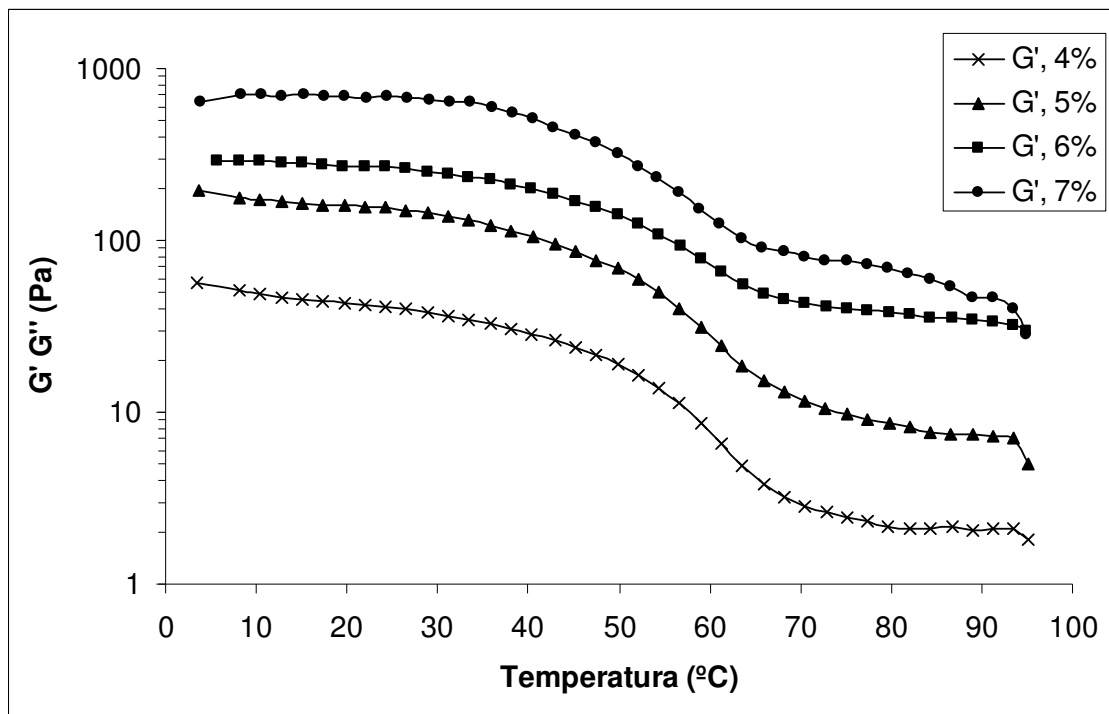
Os resultados indicam que a força do gel aumenta com o aumento da concentração de amido. Para a amostra a 7% verifica-se que  $G'$  é cerca de dez vezes superior a  $G''$ , caracterizando um gel forte.

Rao e colaboradores (1997), de maneira semelhante, observaram que  $G'$  é fortemente dependente da concentração de amido. Quando a concentração de amido *waxy* (rico em amilopectina) aumentou de 3 para 4%,  $G'$  aumentou de 15 para 75 Pa, e de 4 para 5%,  $G'$  aumentou de 75 para 105 Pa. O valor de  $G'$  foi também correlacionado positivamente com o teor de amilose e a força do gel de amido de milho (CASE *et al.*, 1998).

Evans e Haisman (1979) estudaram a reologia de amidos de milho e batata através de uma escala regular de concentrações e observaram uma relação linear entre o módulo elástico ( $G'$ ) e a concentração. Resultados semelhantes foram encontrados por Ring (1985) para o amido do trigo e do milho; e por Steeneken (1989) e Keetels, van Vliet e Walstra (1996) para amidos de batata e *waxy* de milho.

As amostras foram submetidas a variações de temperatura, de 5 a 95°C, iniciando com aquecimento, seguido de resfriamento. O comportamento do módulo de armazenamento durante o aquecimento está demonstrado na Figura 31.



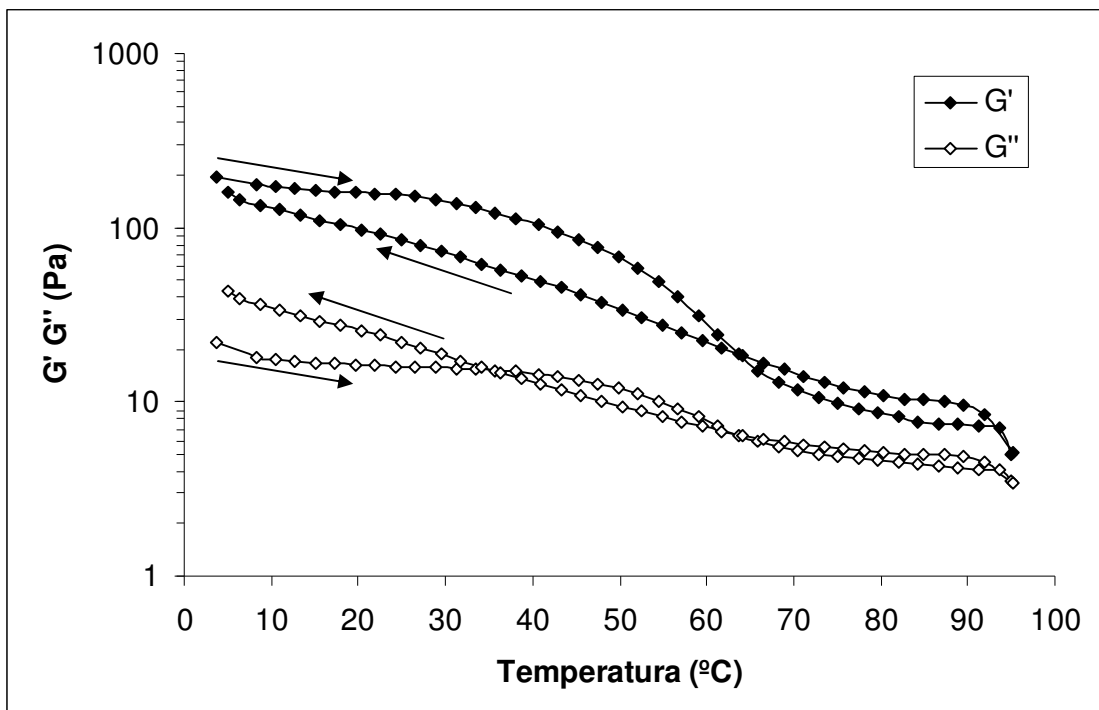


**Figura 31** - Variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) durante o aquecimento dos géis da fração 0.1CA-2 na frequência de 1Hz

Com o aumento da temperatura, houve decréscimo de  $G'$  de uma maneira mais lenta até cerca de 50°C, havendo uma rápida diminuição do módulo em temperaturas mais elevadas. Resultado semelhante foi obtido durante o aquecimento do amido do arroz (TAKO; HIZUKURI, 1999).

Ahmed *et al.* (2008) avaliaram o efeito da concentração de amido do arroz basmati sobre  $G'$  durante a varredura de temperatura em frequência constante. Observaram que a elasticidade ( $G'$ ) do gel de amido tratado termicamente aumentou como função da concentração de amido e diminuiu com a taxa de aquecimento. Isto também pôde ser visualizado para os géis da fração 0.1CA-2.

A rampa de temperatura do gel contendo 5% da fração 0.1CA-2 para um ciclo aquecimento seguido de resfriamento está mostrada na Figura 32.



**Figura 32** - Rampa de temperatura do gel da fração 0.1 CA-2 a 5% na frequência de 1Hz

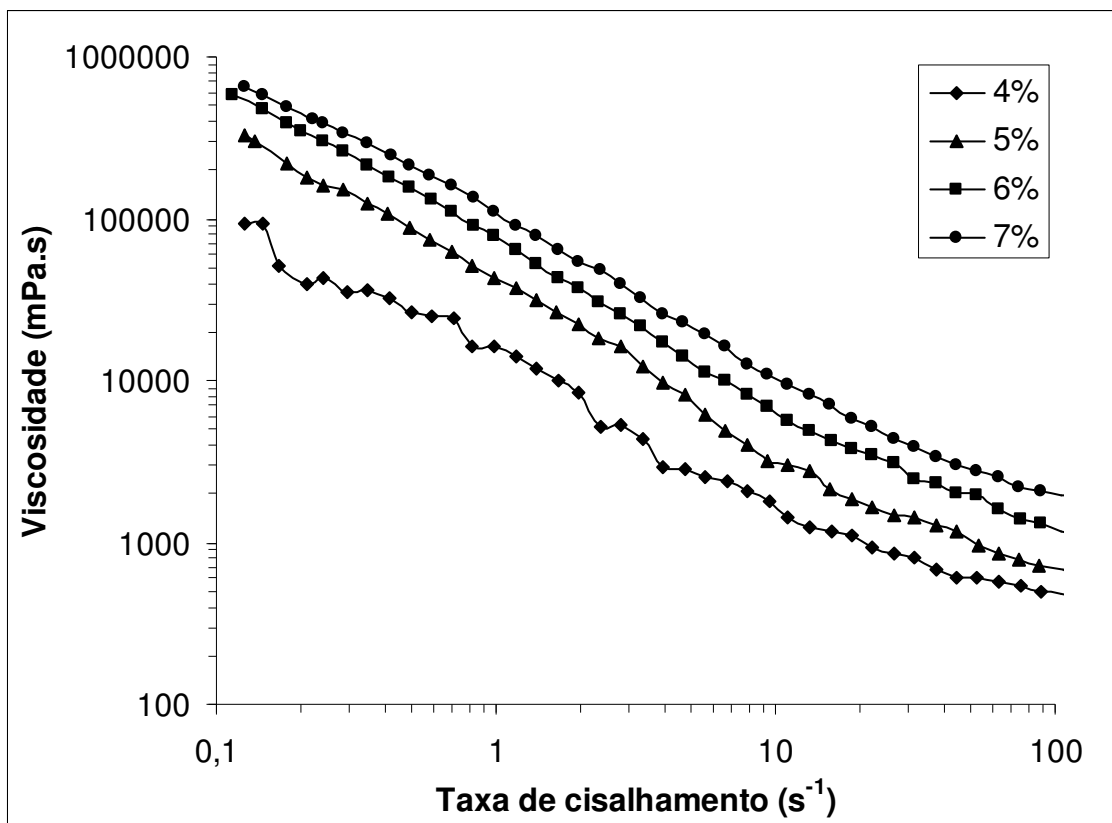
Percebe-se que o valor do módulo  $G'$  sofre um decréscimo de cerca de dez vezes durante o aquecimento, aproximadamente o dobro daquele apresentado por  $G''$ , e durante o resfriamento, ambos os módulos sofrem um aumento gradual, bem mais pronunciado em  $G''$ , de modo que ao atingir 5°C, seu valor apresenta-se superior àquele do início do experimento. Desta maneira, após a variação térmica, a amostra apresentou um menor caráter sólido do que no início do experimento.

O comportamento térmico de amidos é complexo devido às várias modificações que acontecem durante o aquecimento, podendo envolver gelatinização, cristalização, expansão do volume, degradação molecular e movimento da água, entre outros (YU; CHRISTIE, 2001).

A viscosidade de amidos gelatinizados é influenciada pela extensão do inchamento dos grânulos antes de sua quebra, bem como pela expansão e dispersão dos grânulos de amido remanescentes depois que a estrutura granular é quebrada. O volume dos grânulos inchados e sua deformabilidade inerente são importantes na determinação da viscosidade de pastas de amido (HAN *et al.*, 2002).

A Figura 33 mostra curvas de viscosidade para a fração 0.1CA-2 nas concentrações 4-7%. Nota-se um decréscimo da viscosidade com o aumento da

taxa de cisalhamento, caracterizando um comportamento pseudoplástico desta fração nas condições avaliadas. Sob cisalhamento, a estrutura dos grânulos de amido gelatinizados é quebrada, o que causa uma queda na viscosidade (CHRISTIANSON; BAGLEY, 1983; TSAI; LI; LII, 1997).



**Figura 33** - Influência da taxa de cisalhamento na viscosidade absoluta dos géis da fração 0.1CA-2 a 25°C

Para um polímero com uma dada massa molecular, a viscosidade da solução aumenta com a concentração, até atingir uma concentração crítica (GLASS; SCHULZ; ZUKOSKI, 1991). Pela observação da Figura 33, verifica-se que o valor da viscosidade aumenta com o aumento da concentração da fração 0.1CA-2. Por exemplo, em uma taxa de cisalhamento de  $1,2 s^{-1}$ , a viscosidade para as concentrações de 4, 5, 6 e 7% foi, respectivamente, de 14120; 37230; 63960 e 90410 mPa.s.

Os resultados obtidos mostram que a polpa do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) apresenta amido e pectinas com alta viscosidade e capacidade geleificante.

## 6 CONCLUSÕES

A partir da polpa seca de frutos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) inativada e deslipidificada foram obtidas frações contendo pectinas, amido e hemiceluloses.

As extrações aquosas solubilizaram principalmente pectinas, enquanto que as extrações ácidas, em sua maioria, solubilizaram amido. Já as frações obtidas por extrações alcalinas foram constituídas por hemiceluloses.

A principal fração péctica, denominada W-1, foi obtida por extração aquosa a 25° C por 90 minutos (7% de rendimento em relação ao material seco) e é composta principalmente por segmentos de homogalacturonanas com alto grau de esterificação (DE 53,1%; DA 1,7%) e de ramnogalacturonanas com cadeias laterais constituídas de galactose e arabinose, além de conter uma pequena proporção de amido.

As análises reológicas da fração péctica nativa (W-1) e após remoção do amido por tratamento enzimático (PW-1), mostraram que os géis da fração W-1 são positivamente afetados pelo aumento da concentração de pectina e pelo aumento da concentração de sacarose, e que são relativamente estáveis termicamente. Os géis da fração PW-1 apresentaram o mesmo padrão de comportamento, embora sua termoestabilidade e sua estrutura viscoelástica pareceram ser mais frágeis do que aquelas da fração W-1.

A principal fração de amido, denominada 0.1CA-2, foi obtida empregando-se ácido cítrico a 0,1% em banho-maria fervente por 60 minutos (15% de rendimento em relação ao material seco). Apresentando 90,8 mol% de glucose, esta fração mostrou-se constituída principalmente por amido com alto teor de amilose. Quando analisadas reologicamente, as soluções da fração 0.1CA-2 em diferentes concentrações apresentaram comportamento pseudoplástico. A força e a viscosidade dos géis obtidos aumentaram com o aumento da concentração da fração, embora as características dos géis e estabilidade térmica sejam inferiores às observadas para as frações pécticas (W-1 e PW-1).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.

AHMED, J. *et al.* Thermal and dynamic rheology of insoluble starch from basmati rice. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 278-287, 2008.

ALBERSHEIM, P. *et al.* An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 47-55.

ALONSO-MOUGÁN, M. *et al.* Rheological behaviour of an amide pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 123-129, 2002.

ALVES, S.; JENNINGS, W. G. Volatile composition of certain Amazonian fruits. **Food Chemistry**, v. 4, p. 149-159, 1979.

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. In: WALTER, R. H. (Ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. New York: Academic Press, 1991, p. 109-118.

AZEVEDO, A. B. A; KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Extraction of fat from fermented cupuaçu seeds with supercritical solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, p. 223-237, 2003.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 1-25.

BARRETT, A. J.; NORTHCOT, D. H. Apple fruit pectic substances. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 617-627, 1965.

BÉDOUET, L.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Rapid quantification of *O*-acetyl and *O*-methyl residues in pectin extracts. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 379-383, 2003.

BeMILLER, J. N. An introduction to pectin: structure and properties. In: FISHMAN, M. L.; JEN, J. J. (Ed.). **Chemistry & Function of Pectins**. Washington, DC: ACS Symposium Series 310, American Chemical Society, 1986, p. 2-12.

BeMILLER, J. N. Starch-based Gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 579-600.

BEN-NAIM, A. **Hydrofobic interactions**. New York, USA: Plenum Press, 1980. p. 185.

BHATTACHARYA, S. Yield stress and time-dependent rheological properties of mango-pulp. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1029-1033, 1999.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.

BOULANGER, R.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits: 3-Glycosidically bound components of cupuacu. **Food Chemistry**, v. 70, p. 463-470, 2000.

BRINGARD, G. *et al.* Insight into the structure of pectin by high performance chromatographic methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 61-77, 1990.

BULONE, D. *et al.* Role of Sucrose in Pectin Gelation: Static and Dynamic Light Scattering Experiments. **Macromolecules**, v. 35, p. 8147-8151, 2002.

CANTERI-SCHEMIN, M. H. *et al.* Extraction of pectin from apple pomace. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 259-266, 2005.

CARDOSO, S. M.; COIMBRA, M. A.; LOPES da SILVA, J. A. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca<sup>2+</sup> networks: a rheological study. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 801-807, 2003.

CARPITA, N.; McCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: Couries Companies, 2000. p. 52-89.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989, p. 157-216.

CASE, S. E. *et al.* Physical properties and gelation behaviour of a low-amylopectin maize starch and other high-amylose maize starches. **Journal of Cereal Science**, v. 27, p. 301-314, 1998.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Edições CEJUP, 1991: CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. p. 90-91.

CHAAR, J. M. **Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e conservação do seu néctar por meios físicos e químicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.

CHASERI, S. *et al.* Thermal characteristics and composition of fats from *Theobroma* species. **Turrialba**, v. 39, p. 468-473, 1989.

CHATJIGAKIS, A. K. *et al.* FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 395-408, 1998.

CHRISTENSEN, S. H. Pectins. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, FL: CRC Press, 1986, v. III, p. 205-230.

CHRISTIANSON, D. D.; BAGLEY, E. B. Apparent viscosities of dispersions of swollen cornstarch granules. **Cereal Chemistry**, v. 60, p. 116-121, 1983.

CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. Small deformation rheological properties of maltodextrin-milk protein systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 137-148, 1996.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymers gels. **Advanced Polymer Science**, v. 83, p. 57-192, 1987.

COIMBRA, M. A. *et al.* Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 241-248, 1998.

COURRAZE, G.; GROSSIORD, J. L. **Initiation à la rhéologie**. 2 ed. Paris: Lavoisier, 1991. 272p.

COZZOLINO, R. *et al.* Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* radix. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 263-272, 2006.

DARVILL, A. G.; McNEILL, M.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. **Plant Physiology**, v. 62, p. 418-422, 1978.

De VRIES, J. A. Repeating units in the structure of pectin. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Gums and stabilisers from the food industry**. Oxford: IRL Press, 1988, v. 4, p. 25-29.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 205-236.

DÍAZ-ROJAS, E. I. *et al.* Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 293-304, 2004.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-NAWAWI, S. A.; HEIKEL, Y. A. Factors affecting gelation of high-ester citrus pectin. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 381-385, 1997.

ENDRESS, H. U.; DÖSCHL-VOLLE, C.; DENGLER, K. Rheological Methods to Characterize Pectins in Solutions and Gels. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 407-423.

EVAGELIOU, V.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high methoxyl pectin gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 245-259, 2000.

EVANS, I. D.; HAISMAN, D. R. Rheology of gelatinized starch suspensions. **Journal of Texture Studies**, v. 10, p. 347-370, 1979.



FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. Effect of enzymes derived from orange peel on citrus and sugar beet pectins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. **Gums and stabilizers for the food industry 5**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1990. p. 277-280.

FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.41-43.

FILIPPOV, M. P. Practical infrared spectroscopy of pectic substances. **Food Hydrocolloids**, v. 6, p. 115-142, 1992.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FISCHER, N.; HAMMERSCHIMDT, F. J.; BRUNHE, E. J. A. Contribution to the analysis of the flavour of cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflora*). **Fruit Processing**, v. 5, p. 61-65, 1995.

FORNI, E.; PENCI, M.; POLLESELLO, A. A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) and prickly pear (*Opuntia ficus indica*) peel. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 231-234, 1994.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and copoazu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

FREITAS, R. A. **Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos**. 143f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

FREITAS, R. A. *et al.* Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilisssima*) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 3-8, 2004.

FRESHOUR, G. *et al.* Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1413-1429, 1996.

FU, J-T.; RAO, M. A. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 93-100, 2001.

GLASS, J. E.; SCHULZ, D. N.; ZUKOSKI, C. F. Polymers as Rheology Modifiers. In: SCHULZ, D. N.; GLASS, J. E. **Polymers as Rheology Modifiers**. ACS Symposium Series. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 1-7.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. Florida: CRS Press, 1984, v. III, p. 205-229.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 68, p. 327-332, 2000.

GRASDALEN, H.; BAKØI, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183-191, 1988.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Application of Pectinases in beverages. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 453.

GROSSO, C. R. F.; RAO, M. A. Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin +  $\text{Ca}^{+2}$  sugar gels. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 357-363, 1998.

HABIBI, Y. *et al.* Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1119-1127, 2004.

HAN, X-Z. *et al.* Influence of maize starch granule-associated protein on the rheological properties of starch pastes. Part I. Large deformation measurements of paste properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 315-321, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

HILZ, H. *et al.* The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 521-528, 2006.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9-17, 2002.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 215-223, 2004.

ISHII, T. *et al.* The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 13098-13104, 1999.

JANSSON, P-E. *et al.* A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. **Chemical Communications** (Stockholm University), v. 8, p. 1-28, 1976.

JARVIS, M. C. A survey of pectin content of nonlignified monocot cell walls. **Plant Physiology**, v. 88, p. 309-314, 1988.

JOESTEN; M. D.; SCHAAD, L. J. **Hydrogen bonding**. New York, USA: Marcel Dekker, 1974. p. 182.

KAČURÁKOVÁ, M. *et al.* FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 73, p. 393-396, 2001.

KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterization of polymer gels. **Progress in Polymers Science**, v. 23, p. 533-562, 1998.

KEETELS, C. J. A. M.; Van VLIET, T.; WALSTRA, P. Gelation and retrodegradation of concentrated starch systems: gelation. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 343-353, 1996.

KHONDAR, D. *et al.* Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinized waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1296-1301, 2007.

KIM, Y.; TENG, Q.; WICKER, L. Action pattern of *Valencia orange* PME de-esterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2620-2629, 2005.

KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J. I. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross linked by borate-diol ester bonds in higher-plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1017-1020, 1996.

KOUBALA, B. B. *et al.* Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondia cytherea*) obtained using different extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1202-1207, 2008.

KRAVTCHENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 17-25, 1992.

Le GOFF, A. *et al.* Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 325-334, 2001.

LÖFGREN, C.; HERMANSSON, A-M. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 480-486, 2007.

LOOTENS, D. *et al.* Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 237-244, 2003.

LOPES da SILVA, J. A.; GONÇALVES, M. P.; RAO, M. A. Influence of temperature on the dynamic and steady-shear rheology of pectin dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 77-87, 1994.

LOPES da SILVA, J. A.; GONÇALVES, M. P. Rheological study into the ageing process of high methoxyl pectin/sucrose aqueous gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, p. 235-245, 1999.

MacDOUGALL, A. J. *et al.* Calcium gelation of pectin polysaccharide isolated from unripe tomato fruit. **Carbohydrate Research**, v. 923, p. 235-249, 1996.

MALLOVIKOVÁ, A.; RINAUDO, M.; MILAS, M. Comparative interactions of magnesium and calcium counterions with polygalacturonic acid. **Biopolymers**, v. 34, p. 1059-1064, 1994.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 99-107, 2002.

MARCON, M. V. **Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maçã**. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

MATTHEW, J. A. *et al.* Gelation of sugar beet and citrus pectins using enzymes extracted from orange peel. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 295-306, 1990.

MAY, C. D. Industrial pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 79-99, 1990.

McCANN, M. C. *et al.* Old and new ways to probe plant cell-wall architecture. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 103-113, 1995.

McCANN, M. C.; ROBERTS, A. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C. W. (Ed.) **The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 109-129.

MEDEIROS, M. L. *et al.* Sorption isotherms of cocoa and cupuassu products. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 402, 2006.

MELFORD, D. A.; DEY, P. M. Postharvest changes in fruit cell wall. **Advances in Food Research**, v. 30, p. 139-193, 1986.

MELTON, L. D. *et al.* Structural characterization of oligosaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Research**, v. 146, p. 279-305, 1986.

MEYER, L. H. **Food Chemistry**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1960. p. 105-107, 219.

MIYAMOTO, A.; CHANG, K. C. Extraction and Physicochemical Characterization of Pectin from Sunflower Head Residues. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1439-1443, 1992.

MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. **Food Chemistry** (2007), doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.006

MONSOOR, M. A. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. **Carbohydrate Polymers**. v. 61, p. 362-367, 2005.

MORRIS, E. R. Polysaccharide Rheology and In-Mouth Perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 517-546.

MORRIS, V. J. In: MITCHELL, J. R., LEDWARD, D. A. (Eds.). **Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p. 121 (Chapter 3).

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and stabilizers for the food industry**, v. 2, p. 57-58, 1984.

MUKHIDDINOV, Z. K. *et al.* Isolation and structural characterization of pectin homo and rhamnogalacturonan. **Talanta**, v. 53, p. 171-176, 2000.

NAÉ, H. N. Introduction of rheology. In: LABA, D. (Ed.) **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 9.

NAKAMURA, A. *et al.* Analysis of the Molecular Construction of Xylogalacturonan Isolated from Soluble Soybean Polysaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 1155-1158, 2002.

NAZARE, R. F. R. **Cocoa and chocolate substitute production from *Theobroma grandiflorum* seeds, by fermenting, washing, roasting, shelling, milling, etc.** Patent BR9003739-A, 1992 (to Empresa Brasileira de Agropecuária – EMBRAPA).

O'DONOGHUE, E. M.; SOMERFIELD, S. D. Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit. **Food Hydrocolloids** (2007), doi:10.1016/j.foodhyd.2007.07.002

OAKENFULL, D. G. In: WALTER, R. H. (Ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. New York: Academic Press; 1991. p. 88.

OAKENFULL, D. G.; FENWICK, D. E. Thermodynamics and mechanism of hydrophobic interaction. **Australian Journal of Chemistry**, v. 30, p. 741-752, 1977.

OAKENFULL, D. G.; SCOTT, A. Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1093-1098, 1984.

OOSTERVELD, A.; VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 407-413, 2002.

OOSTERVELD, A. *et al.* Effect of deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 249-256, 2000.

PELLERIN, P. *et al.* The pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II is a major component of the polysaccharides present in fruit-derived products. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 67-78.

PÉREZ, S; MAZEAU, K.; du PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 37-55, 2000.

PINHEIRO, E. R. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa): otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PTITCHKINA, N. M. *et al.* Pumpkin pectin: gel formation at unusually low concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 265-273, 1994.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press Research Monograph, 1993. p. 1-27.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1123-1126, 2007.

RAO, M. A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. In: RAO, M. A.; STEFFE, J. F. **Viscoelastic properties of foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 207-231.

RAO, M. A. *et al.* Rheological behaviour of heated starch dispersions in excess water: Role of starch granule. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 273-283, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 61-71.

REDGWELL, R. G; SELVENDRAN, R. R. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion (*Allium cepa*). **Carbohydrate Research**, v. 157, p. 183-199, 1986.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): Chemical features in different tissue zones of the fruit at harvest. **Carbohydrate Research**, v. 182, p. 241-258, 1988.

REES, D. A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 267-332, 1969.

REISDORFF, C. *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., the cupuaçu-tree: additional use option of a cocoa relative. Disponível em: <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/oknu/reisdorff>> Acesso em: 15 abr. 2007.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEM, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

RINAUDO, M. Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 20-33.

RING, S. G. Some studies on starch gelation. **Starke**, v. 3, p. 80-83, 1985.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A. *et al.* The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: A combined molecular modeling and NMR investigation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 651-671, 2003.



ROLIN, C. Pectins. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 257-293.

ROLIN, C.; de VRIES, J. Pectin. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**, c.10. Elsevier Applied Food Science Series, 1990. p. 401-432.

ROLIN, C; NIELSEN, B. U.; GLAHN, P. E. Pectin. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharydes, Structural Diversity and Functional Versatility**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 377-431.

ROS, J. M; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 159-166, 1998.

ROSALINA, I.; BHATTACHARYA, M. Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 191-202, 2002.

SAEMAN, J. F. *et al.* Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SANTOS, M. da S. **Caracterização físico-química e aproveitamento tecnológico do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* S.)**. 173f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SATO, Y. *et al.* Effect of water activity and solvent-ordering on intermolecular interaction of high-methoxyl pectins in various sugar solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 527-534, 2004.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex pectins: structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 3-19.

SCHOLS, H. A. *et al.* Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 343-360, 1995a.

SCHOLS, H. A. *et al.* A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. **Carbohydrate Research**, v. 279, p. 265-279, 1995b.

SCHOLS, H. A. *et al.* Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 343-360, 1995c.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. **The chemical structure of pectins**. In: SEYMOUR, G. B.; KNOX, J. P. (Eds.). Oxford: Black-well Publishing, 2002. p. 1-29.

SCHOTT, H. Reologia. In: GENNARO, A. R. **Remington: Farmacia**, Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana, 1992. v. 2, p. 446-481.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. São Paulo: Artliber, 2006. 233p.

SHARMA; S. K.; LIPTAY, A.; Le MAGUER, M. Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. **Food Research International**, v. 30, p. 543-547, 1998.

SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. p. 70-104.

SINGTHONG, J. *et al.* Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krue Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 391-400, 2004.

SINGTHONG, J. *et al.* Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 793-801, 2005.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

SPELLMAN, M. W. *et al.* Isolation and characterization of 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose, a naturally occurring, branched side-chain, acidic monosaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 122, p. 115-129, 1983.

STEENEKEN, P. A. M. Rheological properties of aqueous suspensions of swollen starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p. 23-42, 1989.

STEPHEN, A. M; CHURMS, S. C. Introduction. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 7.

STEVENSON, D. G. *et al.* Structural and physicochemical characteristics of winter squash (*Cucurbita maxima* D.) fruit starches at harvest. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 153-163, 2005.

STEVENSON, T. T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell wall. **Journal of Plant Physiology**, v. 46, p. 739-744, 1988.

STEVENSON, D. G.; DOMOTO, P. A.; JANE, J. Structures and functional properties of apple (*Malus domestica* Borkh) fruit starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 432-441, 2006.

STONE, B. A; ANDERSON, M. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 115-129, 1985.

TAKO, M.; HIZUKURI, S. Gelatinization mechanism of rice starch. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 18, p. 573-584, 1999.

TAMAKI, Y. *et al.* Isolation and structural characterization of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry** (2007), doi 10.1016/j.foodchem.2007.08.027

TAYLOR, R. L; CONRAD, H. E. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides following Reduction of Their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1389, 1972.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

THIBAUT, J. F.; RINAUDO, M. Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation. **Biopolymers**, v. 25, p. 455-468, 1986.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses. Part I. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 19, p. 247-302, 1964.

TISKITA. **Organic tropical fruit collection**. Disponível em: <[http://www.tiskita-lodge.co.cr/fruit\\_collection](http://www.tiskita-lodge.co.cr/fruit_collection)> Acesso em: 10 jan. 2008.

TSAI, M. L.; LI, C. F.; LII, C. Y. Effect of granular structures on the pasting behaviours of starches. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 750-757, 1997.

TSOGA, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Role of cosolutes in gelation of high-methoxyl pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 907-919, 2004.

TURQUOIS, T. *et al.* Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: Influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 255-262, 1999.

Van BUREN, J. P. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: **The Chemistry and Technology of Pectin**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 1-22.

Van HUNG, P.; MAEDA, T.; MORITA, N. Waxy and high-amylose wheat starches and flours-characteristics, functionality and application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 448-456, 2006.

VARNER, J. L.; LIN, L. S. Plant cell architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

VASCONCELOS, M. N. L. *et al.* Estudo químico das sementes do Cupuaçu. **Acta Amazonica**, v. 3, p. 293-295, 1975.

VENTURIERI, G. A. Usos, análises químicas e derivados potenciais. In: VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**. Belém, Clube do Cupu, 1993.

VENTURIERI, G. A.; AGUIAR, J. P. L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd ex spreng) Schum), **Acta Amazonica**, v. 18, p. 3, 1988.

VIDAL, S. *et al.* Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: Evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**, v. 326, p. 277-294, 2000.

VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, C. L. M. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 1-7, 2000.

VIGNON, M. R.; GARCIA-JALDON, C. Structural features of the pectic polysaccharides isolated from retted hemp bast fibres. **Carbohydrate Research**, v. 296, p. 249-260, 1996.

VORAGEN, A. G. J. *et al.* Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 287-340.

VRIESMANN, L. C. *et al.* Acidic Polysaccharides from *Psidium cattleianum* (Araçá). In: **5<sup>th</sup> International Symposium On Natural Polymers And Composites And 8<sup>th</sup> Brazilian Symposium And Other Wood Components On The Chemistry Of Lignins**, São Pedro. p. 307-309, 2004a.

VRIESMANN, L. C. *et al.* Polissacarídeos de frutos do cambuí (*Myrciaria tenella*, Berg). **Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 10, n. 3, p. 41-45, 2004b.

WALKINSHAW, M. D.; ARNOTT, S. Conformations and interactions of pectins : II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 153, p. 1075-1085, 1981.

WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego: Academic Press, 1998.

WANG, X.S.; LIU, L.; FANG, J.N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 95-101, 2005.

WESTERENG, B. *et al.* Effects of extraction conditions on the chemical structure and biological activity of white cabbage pectin. **Carbohydrate Polymers** (2007), doi: 10.1016/j.carbpol.2007.07.017

WHISTLER, R. L. Introduction to Industrial Gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 1-19.

WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. St Paul: Eagan Press, p. 117-151, 1997.

WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36, p. 215-264, 1979.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetilation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65, 1963b.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Research Monograph, 1993. p. 127-143.

YAPO, B. M. *et al.* Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1356-1364, 2007.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow Passion Fruit Rind-A Potential Source of Low-Methoxyl Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2738-2744, 2006.

YORK, W. S. *et al.* 3-Deoxyl-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 109-126, 1985.

YU, L.; CHRISTIE, G. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 179-184, 2001.

ZOBEL, H. F.; STEPHEN, A. M. Starch: Structure, Analysis, and Application. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 19-66.